Molekulare Struktur Transposon Tn10 codierter Tetrazyklinresistenzgene und die Regulation ihrer Transkription

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Klaus Schollmeier

aus Viernheim

Düsseldorf

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543925_0075

Molekulare Struktur Transposon Tn10 codierter Tetrazyklinresistenzgene und die Regulation ihrer Transkription

Inaugural - Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Klaus Schollmeier
aus Viernheim

Düsseldorf
1985

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Hillen
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. C.P. Hollenberg
Tag der Einreichung:	22. Mai 1985
Tag der mündlichen Prüfung:	27. Juni 1985

Meinen Eltern

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Hillen, unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde. Durch seine Diskussionsbereitschaft und seine intensive Betreuung trug er sehr zum Gelingen dieser Arbeit bei.
Herrn Prof. Dr. H.G. Gassen möchte ich für die Unterstützung meiner Arbeit danken.
Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für viele hilfreiche Anregungen und die sehr gute Zusammenarbeit.
Weiterhin danke ich Dagmar Gärtner, die während Ihres Praktikums einige wichtige Experimente für mich durchführte.
Mein Dank gilt auch den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. H.G. Gassen in Darmstadt und Herrn Prof. Dr. D. Riesner in Düsseldorf für die stete Hilfsbereitschaft.
Nicht zuletzt danke ich Frau H. Gruber für die Reinschrift der hier vorliegenden Dissertation.

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt und am Institut für Physikalische Biologie der Universität Düsseldorf in der Zeit von November 1982 bis März 1985 angefertigt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Abkürzungsverzeichnis	Seite
1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
3	Materialien und Methoden	8
3.1	Materialien mit Bezugsquellen	8
3.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	10
3.3	Synthese von γ^{32}P ATP	10
3.4	Radioaktive Endmarkierung von DNA-Fragmenten	11
3.4.1	5' Endmarkierung mit T4 Polynukleotidkinase	11
3.4.2	3' Endmarkierung mit Polymerase I Klenow-Fragment	12
3.5	DNA-Sequenzierung	13
3.5.1	Die Sequenzierreaktionen	13
3.6	Gelelektrophoresen	15
3.6.1	5% Polyacrylamidgele	15
3.6.2	Agarosegele	17
3.6.3	Polyacrylamid-Harnstoff-Gele	18
3.6.4	Polyacrylamidgele zur Trennung von Protein-DNA-Komplexen	19
3.6.5	Auswertung der Gele	20
3.7	Elution von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen	20
3.8	DE 52 Säulenchromatographie	21
3.9	DNase I - "Footprinting"	22
3.10	Kartierung der 5'- und 3'Enden von mRNAs	23
3.10.1	Präparation von gesamt-RNA aus E.coli	23

3.10.2	S1 Analyse	23
3.11	Radioaktivitätsmessungen	24
3.12	Absorptionsmessungen	25
3.13	Restriktion von DNA	25
3.14	Ligation von DNA	25
3.15	Transformation von E.coli mit Plasmiden	26
3.15.1	Herstellung kompetenter E.coli Zellen	26
3.15.2	Transformation kompetenter Zellen	26
3.15.3	Tabelle der benutzten E.coli Stämme	27
3.16	Schnellanalyse von Plasmiden	27
3.17	Minipräparation von Plasmiden	28
3.18	Plasmidpräparation	29
3.19	Aktivitätsbestimmung der ß-Galaktosidase	31
3.20	Aktivitätsbestimmung der Galaktokinase	32
3.21	Größenstandard für Polyacrylamidgele	33
3.22	Präparation von Colicin	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Sequenzanalyse der Tn10 DNA vom Ende des tetA Gens bis zum rechten IS-Element	36
4.1.1	Sequenzierstrategie	37
4.1.2	Die DNA-Sequenz	39
4.1.3	Restriktionskarte der DNA-Sequenz	41
4.1.4	Promotoren der mRNAs für orfR und orfL	41
4.1.5	Regulation der Transkription von orfR und orfL	46
4.1.6	Biologische Funktion der von orfR und orfL codierten Proteine	48

4.1.7	Ausnutzung der verschiedenen Codons für die Tn*10* codierten Proteine	49
4.2	Termination der Transkription von *tetA* und *orf1*	51
4.2.1	Klonierung des 324 bp *Hae*III Terminatorfragments von Tn*10* in pRT405 und pDS26t	54
4.2.2	Bestimmung der ß-Galaktosidaseaktivität von *E.coli* CSH26/pWH951 und *E.coli* CSH26/pWH961	58
4.2.3	Bestimmung der Galaktokinaseaktivität von *E.coli* N100/pWH952 und *E.coli* N100/pWH962	59
4.2.4	3' Endpunkte der mRNAs	60
4.3	Tn*10* Tet-Repressor - *tet*-Operator Wechselwirkung	64
4.3.1	DNaseI-Footprint von der Tn*10* *tet*-Operator-DNA mit dem Tn*10* Tet-Repressor	65
4.3.2	DNaseI-Footprint des Operators O_1 mit dem Tn*10* Tet-Repressor	69
4.3.3	DNaseI-Footprint des Operators O_2 mit dem Tn*10* Tet-Repressor	71
4.3.4	DNaseI-Footprint des RA1 Operators mit dem Tn*10* Tet-Repressor	74
4.4	Veränderung des Abstandes der Tn*10* *tet*-Operatoren O_1 und O_2	79
4.4.1	Konstruktion der Plasmide pWH971 und pWH972	79
4.4.2	Konstruktion der Plasmide pWH973, pWH974 und pWH975	83
4.4.3	Sequenzierung der Plasmide pWH971 bis pWH975	85
4.4.4	Mobilität der Tn*10* Tet-Repressor - *tet*-Operator Komplexe auf Polyacrylamidgelen	89
4.4.5	Relativer Unterschied der Bindekonstanten von den Tn*10* Operatoren O_1 und O_2	91
4.5	Startpunkte der mRNA des *tet*-Repressorgens *in vivo*	95
5	Diskussion	98
6	Literatur	110
7	Anhang I	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A_{650}	Absorption bei 650 nm
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie
cpm	Zählimpulse pro Minute
d	desoxy
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
Doc	Desoxycholsäure
DTE; DTT	Dithioerithrol - threitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
KDa	10^3 Dalton
M	mol · l^{-1}
mM	mol · l^{-1} · 10^{-3}
mg	Gramm · 10^{-3}
mRNA	messenger RNA
µg	Gramm · 10^{-6}
PPO	2.5. Diphenyloxazol
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tn10	Transposon 10
UV	ultraviolett
V	Volt

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Transposon Tn*10* enthält die genetische Information für eine induzierbare Tetrazyklinresistenz. Auf zwei von insgesamt 6,5 kbp des zentralen Teils von Tn*10* sind zwei Gene, *tetA* für die Resistenz und *tetR* für die Regulation, mit unterschiedlicher Polarität lokalisiert. Sie haben eine gemeinsame Kontrollregion mit überlappenden Promotoren.

Durch DNaseI Schutzexperimente wird gezeigt, daß das *tetR* Genprodukt zwei 19 bp lange nahezu identische palindromische DNA-Sequenzen erkennt und mit einer Stöchiometrie von jeweils 2:1 besetzt. Diese Operatoren O_1 und O_2 überlappen mit den Promotoren der Gene *tetA* und *tetR* und haben einen Abstand von 30 bp. Im Gegensatz zu dem perfekt palindromischen Operator O_1 weist O_2 an Position 7 einen Basenpaaraustausch von A/T nach G/C auf. Die DNaseI Schutzexperimente implizieren einen unsymmetrischen Repressor-Operator O_2 Komplex dessen Assoziationskonstante etwa dreimal so groß ist wie die des symmetrischen Repressor-Operator O_1 Komplexes. Mutanten, bei denen der Abstand zwischen den Operatoren O_1 und O_2 von 30 bp auf 54, 59, 63, 118 und 126 bp vergrößert wurde, zeigen eine ähnliche Bindung an den Tet-Repressor wie die Wildtypanordnung der beiden Operatoren. Die DNA weist im Repressor - Operator-Komplex keine Änderung ihrer Persistenzlänge auf. Eine Verformung der DNA durch Repressorbindung ist somit unwahrscheinlich.

Die Nukleotidsequenz von Tn*10* zwischen *tetA* und $IS10_R$ zeigt die zwei neuen Gene *orfL* und *orfR*. Auch diese haben eine bidirektionale Anordnung. Ihre *in vivo* Transkriptionsstartstellen überlappen sich um 18 Nukleotide. Die mögliche Regulation der Expression dieser Gene wird aufgrund von palindromischen DNA Bereichen diskutiert. Zwischen den Strukturgenen *tetA* und *orfL* befindet sich ein Transkriptionsterminator. Die Messung der Aktivität dieses DNA-Bereichs in beiden Orientierungen zeigt, daß diese DNA-Sequenz *in vivo* bidirektionale Terminatoraktivität besitzt. Die S1 Analyse der 3' Enden der mRNAs beweist, daß die gleiche palindromische Terminatorsequenz in beiden Richtungen aktiv ist.

2 EINLEITUNG

Die Resistenz von bakteriellen Krankheitserregern gegen Antibiotika ist ein sich immer mehr ausbreitendes Phänomen, das vor allem auf die rasche Verbreitung von bereits vorhandenem genetischem Material resistenter Bakterienstämme zurückzuführen ist. Die Resistenzgene sind dabei oft auf sogenannten R-Faktoren lokalisiert (Ptashne und Cohen, 1975; Hu et al., 1975). Dies sind Plasmide, also ringförmige DNA-Doppelstrangmoleküle, die die Fähigkeit zur autonomen Replikation besitzen und zwischen verschiedenen Bakterienspezies ausgetauscht werden können (Helinski, D.R. 1973; Clowes, R. 1972). Auf einem R-Faktor sind oft mehrere Antibiotikaresistenzdeterminanten lokalisiert (Falkow, S. 1975). Eine solche Determinante vermittelt die Resistenz gegen das Antibiotikum Tetrazyklin dessen Strukturformel in Abbildung 2.1 gezeigt ist.

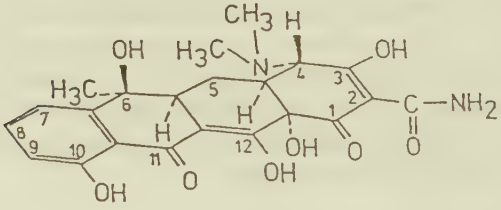


Abb. 2.1: Strukturformel des Antibiotikums Tetrazyklin

Dieses Antibiotikum verhindert die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die Aminoacylstelle der 30S Untereinheit des Ribosoms und blockiert damit die Proteinbiosynthese (Suarez und Nathans, 1965; Hierowski, M. 1965; Suzuka et al., 1966). Durch in vitro Bindeexperimente wurde

festgestellt, daß mehrere ribosomale Proteine mit dem Antibiotikum Tetrazyklin assoziiert sein können (Last, J.A. 1969; Werner et al., 1975). Tritton konnte aber zeigen, daß die E.coli Ribosomen nur eine spezifische Bindestelle für das Antibiotikum besitzen, und daß auch ein Molekül Tetrazyklin pro Ribosom genügt, um die Proteinbiosynthese zu inhibieren (Tritton, T.R. 1977). Daher würde man vermuten, daß resistente Organismen ihre Ribosomen direkt vor dem Angriff des Antibiotikums schützen entweder durch ein verändertes ribosomales Protein, welches die Tetrazyklinbindestelle nicht mehr besitzt, oder durch ein zusätzliches Protein, das die Antibiotikabindestelle maskiert.

Für die Ausprägung der Tetrazyklinresistenz werden aber zwei unterschiedliche Mechanismen diskutiert (Shales et al., 1980):

1) Resistenz gegen Tetrazyklin durch eine Verminderung der Konzentration des Antibiotikums in der Zelle
2) Resistenz gegen Tetrazyklin, wobei sich das Antibiotikum ungehindert in der Zelle ansammeln kann

Für Mechanismus eins ist ein Membranprotein identifiziert worden, welches Tetrazyklin energieabhängig aus der Zelle transportiert (Ball et al., 1980; McMurry et al., 1980). Dieser Exportmechanismus ist bei allen bisher untersuchten Tetrazyklinresistenzdeterminanten Gram-negativer Bakterien gefunden worden. Für Mechanismus zwei wird eine Desensibilisierung der Ribosomen diskutiert (Shales et al., 1980). Obwohl es Hinweise dafür gibt, daß einige Tetrazyklinresistenzdeterminanten auch die genetische Information für Mechanismus zwei besitzen (Williams und Smith, 1979; Levy et al., 1977) ist der aktive Transport des Antibiotikums aus der Zelle bisher der einzige Tetrazyklinresistenzmechanismus in Gram-negativen Bakterien, der eine deutlich meßbare Erhöhung der letalen Antibiotikakonzentration bewirkt.

In jüngster Zeit konnten Ohnuki und Mitarbeiter zeigen, daß der Oxytetrazyklinproduzent Streptomyces rimosus zwei Mechanismen besitzt, um sich vor dem eigenen Antibiotikum zu schützen. Einmal einen Proteinfaktor, der die Ribosomen vor dem Tetrazyklin schützt, und zum

zweiten ein Transportprotein, welches die Konzentration des Oxytetrazyklins in der Zelle vermindert (Ohnuki et al., 1985). Damit besitzt der Gram-positive Antibiotikaproduzent sowohl den in Gram-negativen Bakterien bewiesenen Exportmechanismus als auch den in Gram-negativen Bakterien vermuteten Resistenzmechanismus an den Ribosomen.

Bis jetzt sind bei den Gram-negativen Bakterien mehr als 225 Tetrazyklinresistenzdeterminanten isoliert worden (Marshall et al., 1983). Einige von ihnen wurden nach folgenden Kriterien näher untersucht (Mendez et al., 1980).

- Restriktionsanalysen der Tetrazyklinresistenzdeterminanten
- Messung der letalen Tetrazyklinkonzentration
- Messung der letalen Konzentration für die beiden Tetrazyklinderivate Minozyklin (Jarolman et al., 1970) und Chelocardin (Oliver et al., 1962)
- Hybridisierung eines DNA-Fragmentes, das die genetische Information für die Tetrazyklinresistenz besitzt, gegen die DNA anderer Tetrazyklinresistenzdeterminanten.

Aus diesen Untersuchungen folgte die Einteilung der Tetrazyklinresistenzen in die vier Klassen A, B, C und D (Mendez et al., 1980). Die vier Klassen sind mit einigen ihrer Vertreter in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Klasse	Plasmide
A	RP1; RP4; R446b; pJP15; pJP7; pJP113
B	R222 (In10); pJP69; R136; R455; R 68ε; R7; R621a; R124; R64; R724
C	pSC101; R144; SP219; pR120;
C	RA1

Tabelle 2.1: Klasseneinteilung der Tetrazyklinresistenzdeterminanten (Mendez et al., 1980).
Die bisher am besten untersuchten Vertreter der 4 Klassen sind unterstrichen

Allen diesen Tetrazyklinresistenzdeterminanten ist gemeinsam, daß sie auf Plasmiden lokalisiert sind und daß die Resistenz durch subletale Dosen des Antibiotikums Tetrazyklin induzierbar ist (Izaki et al., 1966; Franklin, 1967; Franklin und Rownd, 1973; Mendez et al., 1980).

Molekulargenetische Untersuchungen zur Tetrazyklinresistenz wurden zuerst an den auf dem Transposon Tn10 codierten Tetrazyklinresistenzgenen durchgeführt. Dieses Transposon wurde aus dem Resistenzfaktor R222 von Klasse B isoliert. Es ist 9300 bp lang und besitzt an beiden Enden 1400 bp lange IS Elemente (Jorgensen et al., 1979; Halling et al., 1982). Experimente zur Expression von Tn10 codierten Genen *in vivo* und *in vitro* ergaben, daß die Synthese dreier Polypeptide mit Molekulargewichten von 15 kDa, 25 kDa und 36 kDa durch Tetrazyklin induzierbar ist (Jorgensen und Reznikoff, 1979; Zupancic et al., 1980; Yang et al., 1976). Das größte der drei Proteine ist ein Membranprotein, welches Tetrazyklin aktiv aus der Zelle transportiert (McMurry et al., 1980; Hillen und Schollmeier, 1983). Das 25 kDa Protein ist ein Repressorprotein, das die Synthese beider Proteine coreguliert (Yang et al., 1976; Wray et al., 1981; Postle et al., 1984). Eine Funktion für das 15 kDa Protein konnte bisher noch nicht gefunden werden.

Die Gene für das 36 kDa Tetrazyklinresistenzprotein (*tetA*) und den Tetrazyklinrepressor (*tetR*) starten an einer gemeinsamen DNA-Region mit sich überlappenden Promotoren und besitzen dabei unterschiedliche Polarität (Hillen et al., 1982; Bertrand et al., 1983). In dieser Genstartregion binden zwei Tet-Repressordimere an die DNA und inhibieren dadurch die Transkription der Gene *tetA* und *tetR*. Dadurch ergibt sich für den Repressor-DNA Komplex eine Stöchiometrie von 4:1. In Anwesenheit des Induktors Tetrazyklin bindet der Tet-Repressor nicht mehr an die DNA (Hillen et al., 1982; Hillen et al., 1983).

Ein Regulationsmodell für die Tn10 codierten Tetrazyklinresistenzgene ist in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt.

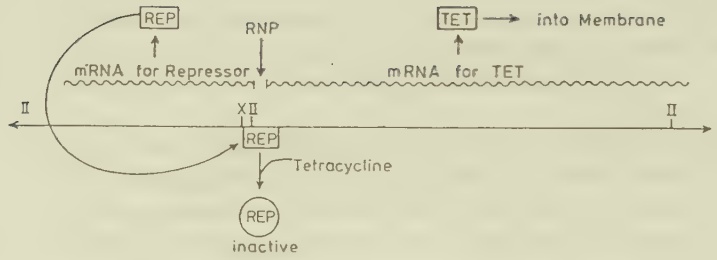


Abb. 2.2: Modell für die Expression der Tetrazyklinresistenz von Tn10
Die durchgezogene Linie stellt einen Teil der Tn10 DNA dar, der durch zwei HincII Stellen (II) begrenzt wird. Die gewellten Linien zeigen die mRNAs von tetA und tetR. X steht für die auf Tn10 nur einmal vorkommende XbaI Stelle. Der DNA-bindende Tet-Repressor (REP) ist als Rechteck gekennzeichnet, der Kreis symbolisiert die für die DNA-Bindung inaktive Form. Die Abbildung ist Referenz (Hillen et al., 1982) entnommen.

In den letzten Jahren wurden auch die Tetrazyklinresistenzdeterminanten von RP1 der Klasse A (Waters et al., 1983); pSC101 der Klasse C (Sutcliffe, 1978; Peden, 1983; Unger et al., 1984a) und RA1 der Klasse D (Unger et al., 1984b) näher untersucht. Vergleicht man die Ergebnisse dieser Experimente mit den Ergebnissen von Tn10 ergeben sich daraus einige Gemeinsamkeiten für die Tetrazyklinresistenzdeterminanten der Vertreter aller 4 Klassen. Es sind immer mindestens zwei Gene, die für die Resistenz gegen das Antibiotikum Tetrazyklin verantwortlich sind. Die beiden Gene, tetA und tetR, starten an einer gemeinsamen DNA-Region mit entgegengesetzter Polarität. Durch Bindung des

Genprodukts von tetR an die Startregion der beiden mRNAs wird die Transkription beider Gene negativ reguliert (Klock et al., 1985). Vergleicht man jetzt die aus den DNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen für die Resistenzproteine bzw. für die Tet-Repressoren miteinander, so weisen die in ihrer Funktion identischen Proteine bis zu 70% Aminosäuresequenzhomologie auf (Unger et al., 1984b). Diese Ergebnisse legen nahe, daß die verschiedenen Tetrazyklinresistenzdeterminanten einen gemeinsamen Ursprung haben, der vielleicht bei dem Tetrazyklinproduzenten Streptomyces rimosus zu suchen ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die Bindestellen des Tet-Repressors auf der Tn10 DNA zu identifizieren. Durch gezielte Mutation der Operatorsequenzen sollte dann der Protein-DNA-Komplex auf molekularer Ebene näher untersucht werden. Weiterhin sollte im Anschluß an die DNA-Sequenz des Tetrazyklinresistenzgens (tetA), die ich während meiner Diplomarbeit ermittelt habe, die etwa 950 bp lange DNA-Sequenz zwischen dem Ende des tetA Gens und dem rechten IS Element bestimmt werden. Da für diese Region schon Promotoraktivität nachgewiesen wurde (Jorgensen et al., 1978), war zu erwarten, daß dort weitere Gene lokalisiert sind. Die Start- und Stoppstellen bei der Transkription dieser Gene sollten in vivo ermittelt werden, um die genetische Organisation dieser DNA-Region aufzuklären. Aus den DNA-Sequenzen der transkribierten Bereiche sollte dann die Aminosäuresequenz abgeleitet werden und durch Sequenzvergleiche mit anderen Proteinen eine mögliche Beteiligung dieser Proteine an der Tetrazyklinresistenz diskutiert werden.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien mit Bezugsquellen

α^{32}P dATP	Amersham
^{32}P anorg. Phosphat	Amersham
Amberlite Mischbettionenaustauscher MB3	Bio Rad
Alkalische Kälberdarmphosphatase	Boehringer
ATP	Boehringer
dNTPs	Boehringer
T4-DNA Ligase	Boehringer
Glaskapillaren	Brand
Ammoniumsulfat	BRL
Saccharose	Caelo
MacConkey Agar	Difco
Entwickler für Röntgenfilme	Du Pont
Fixierer für Röntgenfilme	Du Pont
Brenztraubensäure Natriumsalz	Fluka
Xylencyanol	Fluka
Halbmikroküvetten	Greiner
Röntgenfilme XAR5	Kodak
Bromphenolblau	Merck
Proteinase K	Merck
Sequenzierkit	NEN
Ethanol	Roth
Ether	Roth
Glycerin	Roth
Haushaltsfolie	Roth
Mitomycin C	Roth
Phenol	Roth
Polyethylenglycol Typ 6000	Roth
Polyethylenglycolmonolaurylether	Roth
Toluol	Roth
Acrylamid 2 x krist.	Serva
Dialyseschlauch	Serva

Ethidiumbromid	Serva
Natriumdodecylsulfat	Serva
N,N'Methylenbisacrylamid 2 x krist.	Serva
Siliconlösung	Serva
TMED	Serva
Agar	Sigma
Agarose	Sigma
Ampicillin	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
7-Desoxycholat Natriumsalz	Sigma
Hefeextrakt	Sigma
Lysozym	Sigma
O-Nitrophenyl-ß-D-Galactosid	Sigma
RNaseA	Sigma
Tetrazyklin	Sigma
Trypton	Sigma
Pepton	Sigma
DE 52	Whatman

3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten an ihren 5'-Enden wurde alkalische Kälberdarmphosphatase (Boehringer) benutzt. Das in einer 3,2 M Ammonsulfatlösung suspendierte Enzym wurde durch eine Dialyse von 4 Stunden gegen 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM $MgCl_2$ und 50% Glycerin bei 4°C aufbereitet und konnte bei 4°C über Monate ohne Aktivitätsverlust gelagert werden. Für die Dephosphorylierung wurden 10 pMol (10-20 µl) DNA-Fragment in TE Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 0,1 mM EDTA) mit 1 µl einer 1:50 Verdünnung der Phosphatase versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 45°C wurde die Reaktion abgestoppt. Dies erfolgte entweder durch zweimalige Phenolextraktion (Phenol war mit TE-Puffer gesättigt), oder durch Inkubation des Reaktionsansatzes bei 85°C für 3 Minuten. Bei der Hitzeinaktivierung wurde die Lösung vorher auf 10 mM $MgCl_2$ eingestellt.

3.3 Synthese von $\gamma^{32}P$ ATP

Die Herstellung von $\gamma^{32}P$ ATP erfolgte nach Johnson und Walseth (1979). Hierbei wird durch mehrere enzymatisch katalysierte Reaktionsschritte aus ADP und anorganischem Phosphat ATP synthetisiert.

Der Enzymmix für diese Reaktion setzte sich zusammen aus:

35 µl Glycerophosphatdehydrogenase
1 µl Triosephosphatisomerase
20 µl Glyceraldehyd 3-P-dehydrogenase
2 µl 3 Phosphoglyceratkinase
20 µl Lactatdehydrogenase

10 µl dieses Gemisches wurden in einem 750 µl Eppendorfgefäß 5 Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Sediment in 140 µl E-Puffer gelöst.

Der Reaktionsansatz für die ATP-Synthese setzte sich aus 20 µl A-Puffer, 3,5 µl 20 mM NAD^+ in H_2O, 2,5 µl 40 mM Natriumpyruvat

(4,4 mg/ml in H_2O, frisch angesetzt), 65 µl $^{32}P_i$ in H_2O (spez. Aktivität ca 9.000 Ci/mmol) und 10 µl Enzymlösung zusammen.
Die Reaktion erfolgte bei 20°C für 30 Minuten. Anschließend wurde 1 µl des Ansatzes dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Für die Chromatographie wurden Polyethylenimincellulosepiatten von Schleicher und Schüll (F 1446 PET LS 254) benutzt.
Als Laufmittel diente 0,8 M Ammoniumsulfat. Die RF-Werte betrugen für P_i 0,9 und für das ATP 0,05. Nach der vollständigen Umsetzung wurde der Reaktionsansatz 2 Minuten auf 85°C erhitzt und bei -20°C aufbewahrt.

A Puffer:

250 mM Hepes, pH 8,2
60 mM $MgCl_2$
30 mM DTT
0,6 mM L- -Glycerolphosphat
0,25mM ADP

E Puffer:

50 mM Hepes; pH 8,2
5 mM DTT

3.4 Radioaktive Endmarkierung von DNA-Fragmenten

3.4.1 5' Endmarkierung mit T4-Polynukleotidkinase

Die radioaktive Phosphorylierung von DNA wurde in Volumina von 20 bis 30 µl durchgeführt. Zu der dephosphorylierten DNA (s. Kap. 3.2) wurden 6 µl $\gamma^{32}P$ ATP (s. Kap. 3.3), 1 µl T4-Polynukleotidkinase und entsprechendes Volumen 10fach PNK-Puffer zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 10 bis 30 Minuten. Das Optimum der Reaktionszeit wurde für jede Enzympräparation neu bestimmt. Der Reaktionsansatz wurde dann durch Zugabe von 200 µl 0,3 M Natriumacetat, 2 µl tRNA (10 mg/ml in H_2O) und 750 µl absolutes Ethanol in flüssigem Stickstoff 3 Minuten gefällt. Nach der Zentrifugation bei 15.000 rpm in einer Hettich Microliter Zentrifuge wurde der Überstand entfernt, das Sediment in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA gelöst und mit 1 ml absolutem Ethanol erneut gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das

Sediment mit 1 ml absolutem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Für die Abgabe von T4-Polynukleotidkinase danke ich den Dipl. Biol. R. Heinzel, V. Eckert und J. Altschmied.

10 fach PNK Puffer

0,4 M Tris-HCl, pH 9,5
0,2 M $MgCl_2$
1,0 mM EDTA

3.4.2 3' Endmarkierung mit Polymerase I Klenow-Fragment

Den Einbau von α^{32}P dNTP's an das 3'Ende von DNA-Fragmenten wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Dabei wurden für 10 pMol DNA-Fragment 30 pMol α^{32}P dNTP (100 µCi) eingesetzt. Zur Unterdrückung der 3' - 5' Exonukleaseaktivität des Enzyms wurde das letzte Nukleotid am 3' Ende in einem 200fach molaren Überschuß (2 nMol) zugegeben. Die Reaktion erfolgte in Klenow-Puffer mit 5 Units Polymerase I Klenow-Fragment für 15 Minuten bei 20°C. Nach der Reaktion wurden 5 µl 0,25 M EDTA, pH 8.0 und 150 µl H_2O zugegeben und die Lösung 10 Minuten auf 70°C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung auf 0,3 M Natriumacetat eingestellt und die DNA durch Zugabe des dreifachen Volumens absolutes Ethanol für 3 Minuten in flüssigem Stickstoff gefällt. Nach der Zentrifugation (15 Minuten; 15.000 rpm) wurde das Sediment mit absolutem Ethanol gewaschen und getrocknet.

10 fach Klenow Puffer

0,5 M Tris-HCl, pH 7,8
0,1 M $MgSO_4$
1 mM DTT
500 µg/ml BSA

3.5 DNA-Sequenzierung

In dieser Arbeit erfolgte die DNA Sequenzierung nach der Methode von Maxam und Gilbert (1977).

Ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment (s. Kap. 3.4) wurde dabei durch geeignete Restriktion in zwei Subfragmente mit jeweils einer radioaktiven Markierung zerlegt. Nach der Isolierung dieser Subfragmente aus einem präparativen Polyacrylamidgel (s. Kap. 3.7) wurden die basenspezifischen Reaktionen nach Maxam und Gilbert durchgeführt (siehe unten). Anschließend wurden die Reaktionsprodukte auf Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen aufgetrennt (s. Kap. 3.6.3) und autoradiographisch sichtbar gemacht (s. Kap. 3.6.5).

3.5.1 Die Sequenzierreaktionen

Unter den verschiedenen Möglichkeiten der chemischen Modifikation von DNA zur Sequenzierung (Maxam und Gilbert 1980) wurden folgende vier Reaktionen ausgewählt:

Spaltstelle	Reagenz
G > A	Dimethylsulfat
G + A	Piperidiniumformiat
C + T	Hydrazin
C > T	Hydrazin + 2 M NaCl

In Tabelle 3.1 ist das detaillierte Arbeitsschema wiedergegeben. Die Reagenzien wurden aus dem "DNA Sequencing Kit NEK-010" von NEN, Dreieich verwendet. Die Durchführung erfolgte ausschließlich in silikonisierten Eppendorf Gefäßen. Als Träger-DNA diente ultraschallbehandelte Plasmid-DNA (pVH51; 1 mg/ml), die auf einem Polyacrylamidgel Banden über das gesamte Gel zeigte. Als tRNA wurde unspezifische tRNA aus Hefe verwendet (10 mg/ml in H_2O). Die eingesetzte DNA war in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA gelöst. Die für die Sequenzierung von einem Polyacrylamidgel eluierten DNA-Fragmente waren ausnahmslos über

G(G > A)	A(G + A)	T(C + T)	C(C > T)
5 µl DNA + 1 µl carr. DNA + 2 µl tRNA; + 200 µl Na-cacodylat-Lsg. + 0,5 µl DMS 5 min 20°C	10 µl DNA + 1 µl carr. DNA + 2 µl tRNA; + 10 µl H_2O + 3 µl Piperidiniumformiat 12,5 min 37°C	10 µl DNA + 1 µl carr. DNA + 2 µl tRNA; + 10 µl H_2O + 30 µl Hydrazin 5 min 20°C	5 µl DNA + 1 µl carr. DNA + 2 µl tRNA; + 15 µl 5 M NaCl + 30 µl Hydrazin 5 min 20°C
+ 50 µl DMS-Stop + 750 µl EtOH; Fällung	in fl. N_2 einfrieren lyophilisieren ca. 1h	+ 200 µl Hydrazin-Stop + 750 µl EtOH; Fällung	+ 200 µl Hydrazin-Stop + 750 µl EtOH; Fällung
Sediment in 250 µl Hydrazin-Stop gut lösen, + 750 EtOH; Fällung		Sediment in 250 µl Hydrazin-Stop gut lösen, + 750 EtOH; Fällung	Sediment in 250 µl Hydrazin-Stop gut lösen, + 750 EtOH; Fällung
Überstand vollst. entfernen Sediment in 50 µl 0,4 M NaCl lösen, + 1 ml EtOH; Fällung; mit 1 ml EtOH spülen, Sediment trocknen	lösen in 20 µl H_2O in fl. N_2 einfrieren lyophilisieren ca. 1 h	Überstand vollst. entfernen Sediment in 50 µl 0,4 M NaCl lösen, + 1 ml EtOH; Fällung; mit 1 ml EtOH spülen, Sediment trocknen	Überstand vollst. entfernen Sediment in 50 µl 0,4 M NaCl lösen, + 1 ml EtOH; Fällung; mit 1 ml EtOH spülen, Sediment trocknen
+ 50 µl 1 M Piperidin, Sediment gut lösen, Teflonband, 30 min 90°C	+ 50 µl 1 M Piperidin, Sediment gut lösen, Teflonband, 30 min 90°C	+ 50 µl 1 M Piperidin, Sediment gut lösen, Teflonband, 30 min 90°C	+ 50 µl 1 M Piperidin, Sediment gut lösen, Teflonband, 30 min 90°C
Gefäße wechseln, + 50 µl 0,3 M Na-Ac, 1 µl tRNA + 400 µl EtOH; Fällung,	Gefäße wechseln, + 50 µl 0,3 M Na-Ac, 1 µl tRNA + 400 µl EtOH; Fällung,	Gefäße wechseln, + 50 µl 0,3 M Na-Ac, 1 µl tRNA + 400 µl EtOH; Fällung,	Gefäße wechseln, + 50 µl 0,3 M Na-Ac, 1 µl tRNA + 400 µl EtOH; Fällung,
Sediment mit 1 ml EtOH spülen; trocknen, in 20 µl H_2O lösen, in fl. N_2 einfrieren, lyophilisieren	Sediment mit 1 ml EtOH spülen; trocknen, in 20 µl H_2O lösen, in fl. N_2 einfrieren, lyophilisieren	Sediment mit 1 ml EtOH spülen; trocknen, in 20 µl H_2O lösen, in fl. N_2 einfrieren, lyophilisieren	Sediment mit 1 ml EtOH spülen; trocknen, in 20 µl H_2O lösen, in fl. N_2 einfrieren, lyophilisieren

Tabelle 3.1: Experimentelle Durchführung der Sequenzierung nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980)

DEAE-Cellulose gereinigt (s. Kap. 3.8). Die Ethanolfällungen wurden für drei Minuten in flüssigem Stickstoff durchgeführt und anschließend in einer Hettich Microliter Zentrifuge 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Bei der Piperidinreaktion wurden die Reaktionsgefäße mit Teflonband abgedichtet und während der Inkubation in einem speziell dafür angefertigten Aluminiumblock fest verschlossen gehalten. Nach der Piperidinreaktion wurden die Proben in neue Eppendorfgefäße überführt. Die abschließende Lyophylisierung erfolgte generell über Nacht mindestens jedoch für drei Stunden

Puffer:

G-Reaktionspuffer:	Hydrazin-Stop:	DMS-Stop:
50 mM Natriumcacodylat	0,3 M Natriumacetat	1,5 M Natriumacetat
10 mM Magnesiumchlorid	0,1 mM EDTA	1 M Mercaptoethanol
0,1 mM EDTA	25 µg tRNA/ml	100 µg tRNA/ml

3.6 Gelelektrophoresen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten (Kap.3.6.1) oder Plasmiden (Kap. 3.6.2), sowie für Sequenzanalysen (Kap. 3.6.3) und für die Beobachtung von Protein-DNA-Komplexen (Kap. 3.6.4) wurden verschiedene Gelelektrophoresen durchgeführt. Sie erfolgten immer vertikal. Die Gele wurden zwischen Glasplatten eingebettet und ihre Dicke durch Abstandshalter vorgegeben. Die Abmessungen der Sequenziergele war 400 x 200 mm bzw. 800 x 200 mm. Alle anderen Gele hatten 200 x 200 mm.

3.6.1 5% Polyacrylamidgele

Mit diesen Gelen wurden Fragmente bis zu einer Länge von 1000 bp aufgetrennt. Das Acrylamid wurde als 40%ige Lösung (w/v) mit einem N,N'-Methylenbisacrylamidanteil von 1,3% angesetzt. Ein Liter dieser Lösung wurde mit 10 g eines Mischbettionenaustauschers von Bio Rad (AG 501-X 8 B) vier Stunden bei 4°C gerührt und anschließend über einen Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wurde in einer abgedunkelten

Flasche aufbewahrt.

Die Gele wurden nach dem am Ende dieses Kapitels aufgeführten Pipettierschema hergestellt. Für hochauflösende Elektrophoresen wurden die Polyacrylamidgele mit Glycerin angefertigt. Ohne Glycerin konnten zwar kürzere Elektrophoresezeiten, aber eine schlechtere Auflösung erzielt werden. Vor der Zugabe von TMED wurde die Lösung 10 Minuten in einer Saugflasche mit Wasserstrahlvakuum entgast. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von TMED und das Gelmaterial konnte dann zwischen die Glasplatten gegossen werden. Nach ca. 1 Stunde war die Polymerisationsreaktion beendet.

Als Elektrophoresepuffer diente TEB-Puffer. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit mindestens 15% Farbmarker I versetzt. In Tabelle 3.2 ist die Verwendung der verschiedenen 5%igen Polyacrylamidgele aufgezeigt. Die Analyse der Gele erfolgte wie in Kap. 3.6.5 beschrieben. Die Nachweisgrenze bei den mit Ethidiumbromid gefärbten Polyacrylamidgelen betrug 0,05 µg pro DNA-Fragment.

Geldicke	Verwendung	V/cm mit Glycerin	V/cm ohne Glycerin
1 mm	radioaktiv analytisch	12,5	17,5
2 mm	analytisch radioaktiv präparativ	10	12,5
3 mm	präparativ	7,5	--

Tabelle 3.2: Anwendung der verschiedenen 5%igen Polyacrylamidgele

Pipettierscheme für 5% Polyacrylamidgele (200 x 200 x 1 mm)

5 ml 40% Acrylamidlösung
4 ml 10fach TEP-Puffer
4 ml Glycerin
27 ml H_2O
200 µl 10% Ammoniumperoxisulfat
40 µl TMED

10fach TEB-Puffer

0,6 M Tris
0,6 M Borsäure
10 mM EDTA
(der pH-Wert stellt sich auf 8,2-8,3 ein)

Farbmarker I

0,1% Bromphenolblau
0,1% Xylencyanol
50 % Glycerin
in TEB-Puffer

3.6.2 Agarosegele

Mit diesen Gelen konnten DNA-Fragmente größer 1000 bp und Plasmide nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Zur Herstellung der Gele wurde zuerst ein 3 cm hoher Acrylamidstopfen in die Gelapparatur einpolymerisiert (s. Kap. 3.6.1). Anschließend wurde 1 g Agarose in 100 ml TAE Puffer suspendiert und im Dampfkochtopf für 10 Minuten oder im Microwellenherd (Philips 5100) für 4 Minuten erhitzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurde die Agaroselösung in die Gelapparatur eingefüllt. Bei Raumtemperatur konnte das Gel nach einer Stunde benutzt werden. Als Laufpuffer diente TAE Puffer. Der Gelauftragspuffer war wie in 3.6.1 beschrieben. Die Gele waren ausschließlich 2 mm dick und die angelegte Spannung betrug maximal 10 V/cm. Die Analyse der Gele erfolgte wie unter 3.6.5 beschrieben. Die Nachweisgrenze bei den mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen betrug 0,02 µg pro Gelbande.

3.6.3 Polyacrylamid-Harnstoff-Gele

Diese denaturierenden Gele wurden bei der DNA-Sequenzierung (Kap. 3.5), beim DNase I "Footprinting" (Kap. 3.9) und bei der S1 Analyse (Kap. 3.10) zur Auftrennung der DNA benutzt. Die Größe der Gele betrug 200 x 400 mm bzw. 200 x 800 mm mit Dicken von 0,3 oder 0,5 mm. Um einen möglichst großen Auflösungsbereich zu erzielen, wurden die Gele mit verschiedenen Anteilen Acrylamid angefertigt (12,5%; 8%; 6%). Richtwerte hierfür sind in Tabelle 3.3 angegeben.

Acrylamid-konzentration	Angelegte Spannung (V/cm)	Wanderungsstrecke der Farbmarker	Marker-position	Anzahl der lesbaren Nukleotide
12,5%	35	BPB = 3/4	BPB 13 bp XC 45 bp	5 - 80
8%	32,5	XC = 5/6	XC 75 bp	70 - 200
6%	30	XC aus dem Gel + 2 Stunden	---	180 - 350

Tabelle 3.3: Elektrophoresebedingungen für denaturierende Sequenziergele

BPB = Bromphenolblau XC = Xylencyanol

Die Zusammensetzung der Gele ist unten aufgeführt. Die Herstellung der Acrylamidstammlösung und des Elektrophoresepuffers, sowie die Aufbereitung der Gellösung ist unter Punkt 3.6.1 beschrieben. Die Glasplatteninnenseiten der Gele wurden sorgfältig mit alkalischem Reiniger gereinigt, getrocknet und dann kurz mit Aceton und Ethanol abgewaschen. Das Einfüllen der Gellösung in den 0,3 mm dicken Gelraum wurde durch einen Trichter, der mit Hilfe einer weichen Masse geformt war (Plastilin), erleichtert. Die aufzutragende DNA wurde in 4 µl Farbmarker II gelöst, 30 Sekunden auf 95°C erhitzt und dann in Eiswasser abgekühlt. Zum Auftragen auf die dünnen Gele wurden ausgezogene Glaskapillaren (Brand 100 µl) benutzt. Bei den Elektrophoresen wurde die angelegte Spannung so gewählt, daß die Temperatur der Glasplatten 40 - 45°C betrug (siehe auch Tab. 3.3) Die Analyse der Gele erfolgte wie unter 3.6.5 beschrieben.

Farbmaker II

98% Formamid
0,05% Bromphenolblau
0,05% Xylencyanol
1% H_2O

Zusammensetzung der Acrylamid-Harnstoff-Gele (Volumen für 800 x 200 x 0,5 mm Gele)

Acrylamidkonzentration	12,5%	8%	6%
Harnstoff (g)	63	63	63
40% Acrylamid (ml)	46,8	30	22,5
10fach TEB (ml)	15	15	15
10% APS (µl)	750	750	750
TMED (µl)	48	48	48
	Auffüllen auf 150 ml mit H_2O		

3.6.4 Polyacrylamidgele zur Trennung von Protein-DNA-Komplexen

Die Verzögerung von DNA-Fragmenten auf 5%igen Polyacrylamidgelen durch DNA bindende Proteine wurde wie beschrieben durchgeführt (Garner und Revzin, 1981; Fried und Crothers, 1981). Die Gele waren wie unter 3.6.1 beschrieben mit Glycerin hergestellt worden. Der Protein-DNA-Komplex wurde in Bindepuffer bei 37°C 15 Minuten inkubiert, mit gleichem Volumen Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 3 V/cm. Der Nachweis der DNA-Banden erfolgte wie unter 3.6.5 beschrieben.

10fach Bindepuffer:

0,1 M Tris-HCl, pH 7,4
0,1 M Kaliumchlorid
0,1 M Magnesiumchlorid
10 mM DTE
1 mM EDTA

Auftragspuffer:

1 x Bindepuffer
+ 10% Glycerin

3.6.5 Auswertung der Gele

Die DNA auf Gelen wurde mit zwei Methoden sichtbar gemacht:

Bei nicht-radioaktiver DNA wurden die Gele in einer 0,001%igen Ethidiumbromidlösung für 10 Minuten gefärbt und dann 10 Minuten in H_2O gewaschen. Anschließend wurden die DNA-Banden unter durchscheinendem UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Sofortbildkamera mit Rotfilter fotografiert.

Die radioaktiv markierte DNA wurde autoradiographisch sichtbar gemacht. Nach dem Entfernen einer Glasplatte wurde das Gel mit Haushaltsfolie (Roth) bedeckt und am Rande in Höhe der Farbmarker mit ^{32}P-haltiger Tinte radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Filme (Kodak Xomat AR) auf die Haushaltsfolie aufgelegt, wenn nötig mit Klebeband befestigt und exponiert. Expositionen von einigen Stunden wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei Expositionszeiten von mehreren Tagen oder Wochen wurden die Gele bei -20°C aufbewahrt, um einer Diffusion der DNA entgegenzuwirken. Anschließend wurden die Filme in Du Pont Entwickler bis zum Sichtbarwerden der Banden entwickelt, in einem 1%igen Essigsäurebad kurz gewaschen und in Du Pont Fixierer für 15 Minuten fixiert. Eine DNA-Bande mit 40.000 cpm (Cerencov Strahlung) ist in einem 1 mm dicken Gel nach 1 Stunde Exposition bei Raumtemperatur sichtbar.

3.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen

µg-Mengen von DNA-Fragmenten wurden durch Elution aus Polyacrylamidgelen gewonnen. Das aus dem Gel ausgeschnittene Acrylamidstück wurde in ein 1,5 ml silikonisiertes Eppendorfgefäß überführt und mit einer Plastikspitze fein zerkleinert. Nach Zugabe von 1 ml Elutionspuffer wurde das Gemisch bei 65°C eine Stunde inkubiert und 15 Minuten in einer Hettich Microliter Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt und das Acrylamid noch einmal mit 1 ml Elutionspuffer

wie oben behandelt. Beide Überstände konnten dann zusammengefaßt, und die DNA über eine DE 52 Säulenchromatographie gereinigt werden (s. Kap. 3.8).

Elutionspuffer:

0,5 M Ammoniumacetat
10 mM Magnesiumacetat
1 mM EDTA
0,1% SDS

3.8 DE 52 Säulenchromatographie

Zur Reinigung von DNA in pMol Mengen wurde DEAE-Cellulose Anionenaustauschermaterial benutzt.
Als Säule diente eine 1 ml Einwegspritze von Fortuna, deren Auslauf durch silikonisierte Glaswolle verstopft worden war.
Das vorgequollene Säulenmaterial DE 52 (Whatman) wurde zunächst in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) suspendiert, dann bis zu einem Säulenvolumen von 150 µl in die vorbereitete Plastikspritze eingefüllt und mit 2 ml TE-Puffer equilibriert. Nach dem Auftrag der DNA wurde die Säule mit 2 ml TE-Puffer gewaschen und die DNA mit 400 µl 2 M NaCl eluiert. Nach Zugabe von 1 ml absolutem Ethanol wurde die DNA in flüssigem Stickstoff 3 Minuten gefällt und anschließend in einer Hettich Microliter Zentrifuge bei 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Sediment in 200 µl 0,3 M Natriumacetat gelöst. Nach Zugabe von 750 µl absolutem Ethanol und anschließender Fällung (wie oben) wurde das Sediment mit 1 ml absolutem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

3.9 DNase I "Footprinting"

Mit dieser Methode wurde die sequenzspezifische Bindung von Protein an DNA untersucht. Dabei wird ein an einem 5' Ende radioaktiv markiertes DNA-Fragment mit und ohne Protein durch DNase I teilweise verdaut. Nach der anschließenden Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (s. Kap. 3.6.3) wird das Bandenmuster durch Autoradiographie sichtbar gemacht (s. Kap. 3.6.5), wobei die geschützten Stellen wie Fußspuren (Footprints) auf der DNA als Lücken zu sehen sind. Mit einer parallel dazu durchgeführten basenspezifischen Sequenzierreaktion des gleichen Fragments (s. Kap. 3.5) können die geschützten Stellen auf der DNA genau zur Sequenz zugeordnet werden (Galas und Schmitz, 1978).

Die DNase I (Boehringer, Grad I) wurde in H_2O gelöst (200 µg/ml) und in Proben von 30 µl bei -20°C aufbewahrt. Der Reaktionssatz erfolgte in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit DNaseI Puffer. Dabei wurde die DNA (ca. 50.000 cpm) mit dem Protein 1 Stunde bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf 20°C abgekühlt und die Reaktion durch Zugabe von DNase I gestartet. Die Reaktionszeit betrug 30 Sekunden. Als Richtwert kann gelten, daß für 0,5 pMol DNA-Fragment einer Länge von 100-200 bp 0,01 µg DNase I günstig sind. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 900 µl absolutes Ethanol mit 0,1 M Natriumacetat und 20 µg/ml tRNA, sofortiger Durchmischung und Überführung der Probe in flüssigen Stickstoff. Nach der darauffolgenden Zentrifugation wurde das Sediment mit 1 ml absolutem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Anschließend sind die Proben auf das entsprechende denaturierende Polyacrylamidgel aufgetragen worden (s. Kap. 3.6.3).

10fach DNase I Puffer:

100 mM Natriumcacodylat, pH 8,0
100 mM $MgCl_2$
50 mM $CaCl_2$
1 mM DTT

3.10 Kartierung der 5'- und 3' Enden von mRNAs

Die S1 Analyse zur Bestimmung von Anfangs- und Endpunkten der Transkription in vivo wurde wie beschrieben durchgeführt (Aiba et al., 1981). Hierbei wird die isolierte mRNA mit dem radioaktiv markierten codogenen Strang der DNA hybridisiert. Die überstehenden Einzelstrangenden werden mit der einzelstrangspezifischen Nuklease S1 hydrolisiert und das verbleibende DNA-Stück auf seine Größe analysiert.

3.10.1 Präparation von gesamt-RNA aus E.coli

Die Zellen wurden in 100 ml LB-Medium kultiviert und bei einer OD_{550} von 0,3 bis 0,4 geerntet. Nach Resuspension der Zellen in 3 ml Puffer 1, wurden 3 ml 60°C heißes Phenol (mit 20 mM Natriumacetat, pH 5,5 gesättigt) zugegeben, 5 Minuten bei 60°C leicht geschüttelt und dann 5 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde dann erneut in 60°C heißem Phenol, wie oben beschrieben, ausgeschüttelt. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase mit dreifachem Volumen Ethanol versetzt, die RNA 30 Minuten bei -70°C gefällt und abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 3 ml Puffer 1 aufgenommen und noch zweimal gefällt. Anschließend wurde die RNA in 1 ml H_2O gelöst und nach der Konzentrationsbestimmung (s.Kap. 3.12) bei -20°C aufbewahrt.

LB-Medium:		Puffer 1:	
1%	Pepton	20 mM	Natriumacetat
0,5%	Hefeextrakt	1 mM	EDTA
1%	NaCl	0,5%	SDS

3.10.2 S1 Analyse

150 µg RNA (s.Kap. 3.10.1) wurden mit radioaktiv markierter DNA (20.000 cpm) über Nacht lyophylisiert und dann in 30 µl Hybridisierpuffer gelöst. Nach Erhitzen auf 75°C für 10 Minuten in einem Haake Wasserbad, wurde der Thermostat abgeschaltet um so die Proben langsam

auf die Endhybridisiertemperatur abzukühlen (37°C - 3 bis 4 Stunden; 28°C - 5 bis 6 Stunden). Nach weiteren zwei Stunden Inkubation bei der entsprechenden Endtemperatur war die Hybridisierung abgeschlossen.

Danach wurden 300 µl S1 Puffer (vortemperiert) dazupipettiert und die Reaktion durch Zugabe von S1 Nuklease (50-250 Units) gestartet, ohne dabei die Gefäße aus dem Wasserbad herauszunehmen. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch zweimalige Phenolextraktion gestoppt, die wässrige Phase zweimal mit Ether ausgeschüttelt und mit dem zweieinhalbfachen Volumen absolutem Ethanol in flüssigem Stickstoff gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das Sediment mit 1 ml absolutem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Gelelektrophorese erfolgte wie unter 3.6.3 beschrieben.

Hybridisierpuffer:	S1 Puffer:
40 mM Pipes, pH 6,	0,28 M NaCl
0,4 M NaCl	0,05 M Natriumacetat, pH 4,6
1 mM EDTA	4,5 mM $ZnSO_4$
80% Formamid	20 µg/ml Träger-DNA (einzelsträngig)

3.11 Radioaktivitätsmessungen

Die Radioaktivität wurde mit einem Tricarb 3330 Packard Szintillationszähler ermittelt. Die Bestimmung von ^{14}C erfolgte auf Whatman DE81 2.3 CMS Filtern mit einer Zählausbeute von 40%. Für die Messung von ^{32}P wurden GF/A Glasfaserfilter verwendet mit einer Zählausbeute von 100%. Als Szintillationsflüssigkeit diente 0,4% PPO in Toluol. Ohne Szintillationsflüssigkeit wurde die Cerenkov-Strahlung von ^{32}P im Tritium-Kanal gemessen. Die Zählausbeute betrug hierbei 25%.

3.12 Absorptionsmessungen

Die UV Absorptionsmessungen wurden zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren durchgeführt. Dabei gilt: 1 mg DNA entspricht einer Extinktion von 20 und 1 mg RNA einer Extinktion von 25 bei 260 nm und 1 cm Schichtdichte (Maniatis et al., 1982). Die Messungen im sichtbaren Bereich wurden zur Bestimmung von Zelldichten durchgeführt. Im UV Bereich wurden Quarzküvetten und im sichtbaren Bereich Greiner-Halbmicro-Küvetten aus Kunststoff benutzt. Die Messungen wurden am Spektralphotometer Varian Cary 118 oder Zeiss PMQ II durchgeführt.

3.13 Restriktion von DNA

Zur Herstellung geeigneter DNA-Fragmente wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Enzyme waren von BRL oder Boehringer gekauft. EcoRI wurde nach bekanntem Verfahren isoliert (Greene et al., 1978). Die Verdauungen erfolgten bei 37°C im Wasserbad (TaqI bei 65°C) mit den vom Hersteller angegebenen Puffer- und Inkubationszeitbedingungen. Bei nicht spaltbarer DNA erwies sich eine PEG-Fällung der Nukleinsäure als vorteilhaft (s.Kap. 3.18).

3.14 Ligation von DNA

Zur Konstruktion von rekombinanten Plasmiden wurden einzelne DNA-Fragmente mit Hilfe des Enzyms T4 DNA-Ligase verknüpft. Die Reaktion erfolgte in T4 DNA-Ligasepuffer und einem Endvolumen von 30-50 µl. Bei DNA-Fragmenten mit überstehenden komplementären Enden wurde die Ligation bei 4°C für 3-4 Stunden mit 1 U Enzym pro µg DNA durchgeführt. Bei DNA-Fragmenten mit glatten Enden erfolgte die Ligation bei 20°C für 16 Stunden mit 10 U Enzym pro µg DNA. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch direkt zur Transformation eingesetzt (s.Kap. 3.15).

10fach Ligasepuffer:

0,5 M Tris-HCl, pH 7,6
0,1 M $MgCl_2$
0,1 M DTT
10 mM ATP

3.15 Transformation von E.coli mit Plasmiden

3.15.1 Herstellung kompetenter E.coli Zellen

Eine 20 ml Bakterienkultur in LB-Medium (s.Kap. 3.10.1) wurde bis zu einer OD_{650} von 0,6 kultiviert. Nach dem Überführen in ein vorgekühltes Zentrifugenröhrchen wurde die Probe 10 Minuten in Eis gestellt und dann in einer Sorvall Zentrifuge mit SS 34 Rotor bei 4°C 10 Minuten mit 8.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Abdekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$-Lösung suspendiert, 20 Minuten in Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Danach erfolgte die Suspension der Zellen in 2 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$-Lösung und eine Inkubation von mindestens 20 Minuten in Eis. Die Zellsuspension konnte dann zur Transformation eingesetzt oder, auf 15% Glycerin eingestellt, bei -70°C aufbewahrt werden.

3.15.2 Transformation kompetenter Zellen

Bei der Transformation wurden zu 200 µl kompetenten Zellen 100 µl SSC/$CaCl_2$-Lösung und ca. 0,1 µg DNA pipettiert. Dieser Ansatz wurde 30 Sekunden auf 37°C erhitzt und dann 90 Minuten in Eis inkubiert. Die Proben wurden dabei in Abständen von 15 Minuten geschüttelt. Anschließend wurden 4 ml LB-Medium zugegeben, die Bakteriensuspension 60 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert und dann jeweils 200 µl auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden dann bei 37°C 14 Stunden inkubiert, und die Transformanten auf neuem Selektionsmedium vereinzelt und analysiert (s.Kap. 3.16 und 3.17). Die Antibiotikakonzentrationen für die verschiedenen Selektionsplatten

sind unten aufgelistet. Bei der Colicinresistenz von pVH51 und seinen Derivaten, wurde dem Transformationsansatz nach der 60 minütigen Inkubation bei 37°C das Colicin zugefügt (s.Kap. 3.22) und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die E.coli Bakterien auf LB-Agarplatten mit 0,5% Doc ausplattiert und wie oben weiterbehandelt.

SSC:

0,15 M NaCl
0,015 M Na_3-Citrat
mit HCl auf pH 7,0 eingestellt

SSC/$CaCl_2$ Lösung:

1 Teil SSC
2 Teile 0,1 M $CaCl_2$
frisch ansetzen

LB Agar:

15 g/l Agar
8 g/l NaCl
10 g/l Casein, enzym.verdaut
5 g/l Hefeextrakt

Konzentration der Antibiotika:

40 mg/l Ampicillin
20 mg/l Tetracyclin

3.15.3 Tabelle der benutzten E.coli Stämme

Stamm	Genotyp	Vektor	Literatur
RRI	$recA^+$, F^-	pVH51	Bolivar et al. (1977)
N 100	galK2, recA13,pro	pDS26t	McKenney et al. (1981)
CSH 26	ara Δ (lacpro)thi,F^-	pRT405	Miller, J.H. (1972)
JF 390		--	Goodman, T., pers.Mitt.
RRIΔM15	lacZΔM15	pUR222	Rüther, U. 1982

3.16 Schnellanalyse von Plasmiden

Zum Nachweis und zur schnellen Größenbestimmung von Plasmiden in E.coli wurden Schnellanalysen durchgeführt. Dabei wurden mit einer Impföse etwa 0,5 cm^2 von dem Bakterienrasen einer Agarplatte abgenommen und in 80 µl Aufschlußpuffer suspendiert. Nach der Zugabe von

6 µl Lysozymlösung (10 mg/ml Lysozym in 50 mM Tris-Ncl, pH 8,0) und Inkubation bei 20°C für 2 Minuten, wurden die Proben 40 Sekunden im Wasserbad auf 100°C erhitzt. Nach der anschließenden Abkühlung in Eis, wurden die Proben 15 Minuten zentrifugiert, die Zelltrümmer mit einer Impföse entfernt und der Überstand mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt. Nach der Durchmischung und 20 minütiger Fällung in Eis wurden die Proben erneut 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Sediment zweimal mit absolutem Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung im Vakuum wurden die Proben in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) aufgenommen, mit 5 µl Farbmarker I versetzt und auf einem Agarosegel analysiert (s.Kap. 3.6.2).

Aufschlußpuffer

8 Vol% Sucrose
5 Vol% Triton
50 mM Tris-HCl, pH 8,0
50 mM EDTA

3.17 Minipräparation von Plasmiden

Die Minipräparation wurde nach Klein et al. (1980) durchgeführt. Dabei wurden die E.coli Bakterien in 10 ml M9-Medium kultiviert. Bei einer OD_{650} von 0,6 erfolgte die Amplifikation durch Zugabe von 75 µl Chloramphenicol (20 mg/ml in Ethanol). Nach weiteren 12-14 Stunden Inkubation auf einem Schüttler, wurden die Zellen durch 10 minütige Zentrifugation bei 6.000 rpm in einer Heraeus Christ Labofuge geerntet, anschließend in 500 µl 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA suspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Lyse der Zellen erfolgte nach Zugabe von 50 µl Lysozymlösung (10 mg/ml Lysozym in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) bei 20°C für 15 Minuten. Danach wurden 500 µl Phenol (mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA gesättigt) zugegeben, die Gefäße dreimal invertiert und für 15 Minuten abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, und mit 300 µl Phenol ausgeschüttelt. Nach der

Phasentrennung durch eine Zentrifugation von 5 Minuten wurde die Phenolphase verworfen und die DNA in der wässrigen Phase durch Zugabe von 1 ml absolutem Ethanol 3 Minuten in flüssigem Stickstoff gefällt. Das bei der anschließenden Zentrifugation erhaltene Sediment wurde zweimal mit absolutem Ethanol gewaschen, in Vakuum getrocknet, und dann in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) gelöst.
Die Ausbeute einer solchen Präparation betrug zwischen 2 und 10 µg Plasmid-DNA. Die Restriktion der DNA erfolgte unter den in 3.13 beschriebenen Bedingungen.
Vor der Gelelektrophorese wurde bei der so gewonnenen DNA noch eine RNase Behandlung durchgeführt. Dies geschah durch Zugabe von 0,4 µg RNaseA pro Probe und Inkubation für 2-3 Minuten bei 20°C. Anschließend konnte die Probe elektrophoretisiert werden.

Alle Lösungen für das M9-Medium wurden getrennt angesetzt, autoklaviert und dann unter sterilen Bedingungen zusammengegeben.

1 l M9-Puffer	M9-Puffer:
20 ml 20% Glucose	7,5 g/l $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$
40 ml 10% Casein, säurehydrolysiert	3 g/l KH_2PO_4
1 ml 1 M $MgSO_4$	5 g/l NaCl
	10 g/l NH_4Cl

3.18 Plasmidpräparation

Zur Gewinnung von großen Mengen Plasmid wurde die Methode nach Hillen et al. (1981) angewendet. Als Ausgangsmaterial dienten dabei E.coli Bakterien, die entweder im 1 Liter-Maßstab in 2 Liter Schüttelkolben oder im 10 Liter Maßstab in einem Fermenter "Microferm" von New Brunswick Scientific Co. gewonnen wurden. Das Wachstum erfolgte entweder in LB-Medium (Kap. 3.10.1) bis in die stationäre Phase oder in M9-Medium, wie in Kap. 3.17 beschrieben.

Die Zellen wurden in einem Beckman JA10 Rotor 20 Minuten bei 6.000 rpm und 4°C geerntet und dann in Saccharosepuffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte in 25 ml Polycarbonatröhrchen, wobei 15 ml Zellsuspension mit 3 ml EDTA (0,5 M EDTA, pH 8,0) und 3 ml Lysozym (20 mg/ml Lysozym in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) versetzt wurden. Nach kurzem Schütteln wurden die Proben 15 Minuten in Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml Brij/Doc-Lösung und eine weitere Inkubation in Eis für genau 10 Minuten. Danach wurde die hochviskose Lösung in einem Beckman Rotor Ti 60 (Ti 52.1) 30 Minuten bei 4°C und 40.000 rpm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde von dem Sediment abdekantiert und nach Zugabe von RNaseA (50 µg RNaseA pro ml Lösung), 30 Minuten in Eis inkubiert. Die RNaseA wurde als Stammlösung (20 mg/ml) in 100 mM Natriumacetat pH 5,5 angesetzt und zur Inaktivierung der DNasen 10 Minuten bei 100°C inkubiert. Nach der RNase Behandlung wurde eine PEG Fällung durchgeführt. Sie erfolgte in Zentrifugenröhrchen durch Zugabe des halben Volumens PEG-Lösung und Inkubation bei 0°C für 30 Minuten. Nach der Zentrifugation im JA 10 Rotor für 20 Minuten bei 4°C und 8.000 rpm, wurde der Überstand verworfen, das Sediment getrocknet und für eine Proteinase K Behandlung im Proteinase K Puffer gelöst.

Die Proteinase K wurde mit einer Konzentration von 10 mg/ml in H_2O angesetzt und bei -20°C aufbewahrt. Die Zugabe der Proteinase K erfolgte bis zu einer Konzentration von 0,5 µg/ml und die Reaktion wurde bei 37°C für 30 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die Probe dreimal phenolisiert (Phenol mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA gesättigt), dann dreimal mit Ether ausgeschüttelt und die DNA mit PEG-Lösung ausgefällt (s.o.) Das Sediment wurde getrocknet, in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) aufgenommen und die DNA-Menge wie unter 3.12 beschrieben, bestimmt.

Saccharosepuffer:	PEG Lösung:
25% Saccharose	30% PEG
50 mM Tris-HCl, pH 8,0	in 1,5 M NaCl

Brij/Doc Lösung:

100 ml 10ige Brig-Lösung
+ 50 ml 10%ige Doc-Lösung

Proteinase K Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 7,8
5 mM EDTA
0,5% SDS

3.19 Aktivitätsbestimmung der ß-Galaktosidase

Die Enzymaktivität der ß-Galactosidase wurde nach der Vorschrift von J.H. Miller (1972) bestimmt. Die E.coli Bakterien wurden dabei in 5 ml M9-Medium (Kap. 3.17) bis zu einer OD_{600} von 0,3 bis 0,7 kultiviert, und dann das Wachstum der Zellen durch Abkühlen der Kulturen auf 0°C abgestoppt. Nach der genauen Bestimmung der Absorption bei 600 nm wurde die Zellsuspension mit Z-Puffer in einem Endvolumen von 1 ml geeignet verdünnt (s.u.). Für jede Bakterienkultur wurden dann vier solcher 1 ml Proben parallel gemessen, um einen Mittelwert bilden zu können.
Zu den 1 ml Proben wurde jeweils 1 Tropfen Toluol aus einer Pasteurpipette zugegeben, 10 Sekunden geschüttelt, und das Toluol dann im Trockenschrank bei 37°C für 40 Minuten evaporiert. Anschließend wurden die Proben im Wasserbad 5 Minuten bei 28°C inkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von 200 µl o-Nitrophenyl-ß-D-Galaktosid (ONPG; auf 28°C vortemperiert), gestartet. Sobald das Reaktionsgemisch eine milchiggelbe Trübung erreicht hatte, wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 M Na_2CO_3-Lösung abgestoppt und die optische Dichte bei 420 nm und 550 nm bestimmt.

Die Verdünnungen der Zellsuspensionen sollten so gewählt werden, daß die Reaktionszeiten zwischen 30 Minuten und 6 Stunden liegen und dabei für OD_{420} Werte zwischen 0,6 und 0,9 gemessen werden. Bei hoher ß-Galaktosidasekonzentration wurden 10 µl Zellsuspension mit 990 µl Z-Puffer verdünnt. Bei geringer ß-Galaktosidasekonzentration wurden 200 µl Zellsuspension eingesetzt (Verdünnung 1:5).

Für die Unitsbestimmung wurde folgende Formel benutzt:

$$\text{Units} = 1.000 \times \frac{OD_{420} - 1{,}75 \times OD_{550}}{t \times v \times OD_{600}}$$

OD_{420} und OD_{550} sind dabei die gemessenen Werte nach der Reaktion, OD_{600} der Wert für die Zelldichte vor der Reaktion, t die Reaktionszeit in Minuten und v das Volumen der eingesetzten Zellsuspension in ml.

3.20 Aktivitätsbestimmung der Galaktokinase

Die Enzymaktivität der Galaktokinase aus E.coli wurde nach der Methode von Mc Kenney et al. (1981) bestimmt. Dabei wurde die Phosphorylierung von ^{14}C-Galaktose durch Galaktokinase in Gegenwart von ATP bestimmt. Die phosphorylierte ^{14}C-Galaktose wurde von der nicht phosphorylierten durch Bindung an Anionenaustauscher-Filterpapier getrennt und über die Menge an gebundener Radioaktivität quantitativ bestimmt.

Die E.coli Bakterien wurden in 100 ml M9-Medium (Kap. 3.17) bis zu einer OD_{650} von ca. 0,9 kultiviert. Nach dem Abstoppen des Wachstums durch Abkühlen des Mediums auf 0°C wurde der exakte Wert für OD_{650} gemessen und von dieser Suspension dann mehrere Aliquots von jeweils 1 OD_{650} in Eppendorfgefäßen hergestellt. Nach einer Zentrifugation von 1 Minute in einer Hettich Microliter Zentrifuge bei 4°C wurden die Überstände entfernt und das Sediment bei -20°C aufbewahrt.
Für den Galaktokinase-Test wurde jeweils ein Aliquot Zellen in 800 µl Lysepuffer suspendiert und mit 200 µl Lysozymlösung 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 20 µl DNaseI Lösung wurde der Ansatz 5 Minuten bei 37°C inkubiert, eine Minute in einer Hettich Microliter Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand in neue vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt. 60 µl dieses Überstandes wurden dann mit

40 µl Reaktionsmix versetzt und 45 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Zweimal 30 µl dieser Probe wurden dann auf zwei DE81 Filterpapiere (DE81 2.3 CMS Whatman) pipettiert und 20 Minuten in 80% Ethanol eingetaucht. Anschließend wurden die Filter 3 x 5 Minuten in H_2O, und 1 x 5 Minuten in absolutem Ethanol gewaschen, getrocknet und ausgewertet (s. Kap. 3.11).

Für die Unitsbestimmung wurde folgende Formel benutzt:

$$\text{Units} = \frac{\text{cpm} \times 100 \times 1{,}2 \times \text{Verdünnung}}{\text{spez Akt.} \times 2{,}22 \times 10^3 \times 50}$$

Die spez. Aktivität der ^{14}C Galaktose betrug 0,5 µCi/µMol.

Die Units aus obiger Formel waren definiert als nmol gebildetes Galaktose-1-Phosphat pro Minute und pro 1 OD Zellen.

Lysepuffer:

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
0,1% EDTA
1 mM DTT

Lysozymlösung:

0,5 mg/ml Lysozym
in Lysepuffer

DNaseI-Lösung:

1 mg/ml DNaseI
0,5 M $MgCl_2$

Reaktionsmix:

0,25 M Tris-HCl, pH 7,8
3,75 mM ATP
8 mM NaF
10 mM $MgCl_2$
25 mM DTT
30 mM ^{14}C Galaktose
(0,5 µCi/µMol)

3.21 Größenstandard für Polyacrylamidgele

Für die Zuordnung von Banden auf Polyacrylamidgelen und für die Ermittlung des Molekulargewichts der DNA-Fragmente wurde das

EcoRI/HaeIII geschnittene Plasmid pVH51 als Größenstandard benutzt. Diese Restriktion ergab Fragmentlängen von 860, 446, 444, 436, 413, 361, 256, 244, 179, 84, 69, 43 und 12 bp.

Neben diesen DNA-Fragmenten traten hauptsächlich zwei weitere DNA-Banden auf, nämlich eine 187 bp und eine 452 bp große Bande. Dies waren Reste von EcoRI Fragmenten, die bei der Benutzung von pVH51 als Vehikel für die Präparation von bestimmten DNA-Fragmenten nicht vollständig abgetrennt werden konnten. Das Bandenmuster dieses Größenstandards sowie die Größenangaben sind in Abb. 3.1 gezeigt.

Abb. 3.1: Längenstandard pVH51 EcoRI/HaeIII

3.22 Präparation von Colicin

Der E.coli Stamm JF390 wurde in 1 Liter LB-Medium bei 37°C kultiviert. Bei einer OD_{650} von 1 wurde 1 mg Mitomycin C in H_2O gelöst zugegeben und bei gleicher Temperatur 6 Stunden geschüttelt. Nach einer Zentrifugation von 20 Minuten bei 4°C und 6.000 rpm im JA10 Rotor von Beckman wurden die Überstände gesammelt und auf 60% Ammoniumsulfat eingestellt. Die Ammoniumsulfatfällung wurde 1 Stunde bei 4°C leicht gerührt und dann 20 Minuten bei 4°C und 10.000 rpm im JA10 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 15 ml 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7.0 aufgenommen und 12 Stunden gegen einen Liter 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,0 bei 4°C dialysiert. Anschließend wurde die bräunliche Lösung über einem 0,22 µm Millipor Filter (Millex GV) filtriert. Bei einer Lagertemperatur von 4°C ist das Colicin ca. 4 Wochen, bei -20°C einige Monate aktiv.
Vor der Benutzung des Colicins bei der Transformation (Kap. 3.15.2) wurde stets ein letal-Dosis-Test durchgeführt, um die optimale Colicinmenge zu bestimmen. Dabei wurden jeweils 200 µl kompetente Zellen mit 3 ml LB-Medium (Kap. 3.10) eine Stunde bei 37°C geschüttelt und dann mit unterschiedlichen Mengen Colicin versetzt. Nach einer weiteren Inkubation bei 37°C für 30 Minuten wurden zweimal 200 µl von jedem Ansatz auf LB-Platten mit 0,5% Doc ausplattiert und ca. 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Für die eigentliche Transformation wurde dann die Colicinmenge benutzt, bei der gerade keine Kolonien mehr auf den Platten gewachsen waren.

4.1 Sequenzanalyse der Tn10 DNA vom Ende des tetA Gens bis zum rechten IS Element

Das Transposon Tn10 ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt. Die bisher bekannten DNA-Sequenzen auf Tn10 sind im unteren Teil der Abbildung durch scharze Balken aufgezeigt. Sie setzen sich aus den DNA-Sequenzen der beiden IS-Elemente (Halling et al., 1981) und aus den Sequenzen für die Tetrazyklinresistenzgene tetA (Schollmeier, Diplomarbeit Darmstadt, 1982; Hillen und Schollmeier, 1983) und tetR (Postle et al., 1984) zusammen.

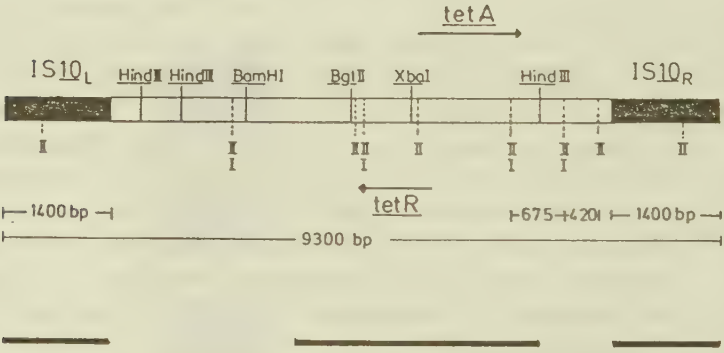


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Transposons Tn10
Die schwarzen Balken im unteren Teil der Abbildung kennzeichnen die bisher bekannten DNA Sequenzen. Mit II sind HincII Stellen und mit I sind HpaI Schnittstellen dargestellt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die DNA-Sequenz von der HindIII Stelle bis zum rechten IS-Element ermittelt (Schollmeier und Hillen, 1984). Damit konnte der Frage nachgegangen werden, ob hier ein weiterer Tetrazyklinresistenzmechanismus codiert ist (Shales et al.,

1980; Chopra et al., 1981; Zupancic et al., 1980). Daß dieser DNA-Bereich RNA-Polymerase-Bindestellen besitzt, war schon früher beschrieben worden (Jorgensen et al., 1978).

4.1.1 Sequenzierstrategie

Das Plasmid pRT61 trägt das gesamte Tn10 (Jorgensen und Reznikoff, 1979). Dieses Plasmid wurde ausgehend von der AvaI Stelle in beide Richtungen und von der HindIII Stelle zur AvaI Stelle sequenziert (siehe Abb. 4.1 und 4.3). Für die Sequenzierung des DNA-Bereichs zwischen der HincII Stelle und dem rechten IS-Element (siehe Abb. 4.3) wurde das Plasmid pCB122 benutzt (C. Beck, pers. Mitteilung). Es enthält das 1050 bp lange rechte HincII Fragment von Tn10 (siehe Abb. 4.1). Hierbei wurde ausgehend von einer einzelnen HindIII Stelle des Vektors die Tn10 DNA bis zum rechten IS-Element sequenziert (siehe Abb. 4.3). Aufgrund der Größe des Plasmids pRT61 (15.000 bp) wurde dann das 675 bp HpaI Fragment und das 420 bp HincII Fragment von Tn10 (s. Abb. 4.1) in geeignete Sequenziervektoren kloniert. Das 675 bp lange HpaI Fragment wurde in die HincII Stelle des Sequenziervektors pUR222 (Rüther et al., 1981) insertiert (siehe Abb. 4.2A) und die Orientierung des 675 bp Fragments in dem rekombinanten Plasmid pWH955 wurde durch eine EcoRI/AvaI Verdauung nachgewiesen (Spur 1 in Abb. 4.2). Das 420 bp lange HincII Fragment wurde in die HincII Stelle von pVH51 insertiert (siehe Abb. 4.2B). Dabei wurden zwei unterschiedliche Plasmide erhalten, pWH956 und pWH957, die die beiden möglichen Orientierungen des 420 bp Fragments repräsentieren. Zur Bestimmung der Orientierung wurden die beiden Plasmide mit RsaI (Spur 3 und 7) und AluI (Spur 5 und 9) restringiert und auf einem 5% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Vergleich diente die RsaI Verdauung (Spur 2 und 4) und die AluI Verdauung (Spur 6 und 8) des Vektors. Aus dem 715 bp RsaI Fragment des Vektors in Spur 2 bzw. 6 entstehen zwei neue Fragmente von 237 bp und 894 bp bei pWH956 in Spur 3 und 615 bp sowie 516 bp bei pWH957 in Spur 7. Aus dem 449 bp AluI Fragment des Vektors in Spur 4 sowie 8 entstehen bei Insertion des 420 bp Fragments drei neue Fragmente mit einer Länge von 275 bp, 187 bp und 403 bp bei

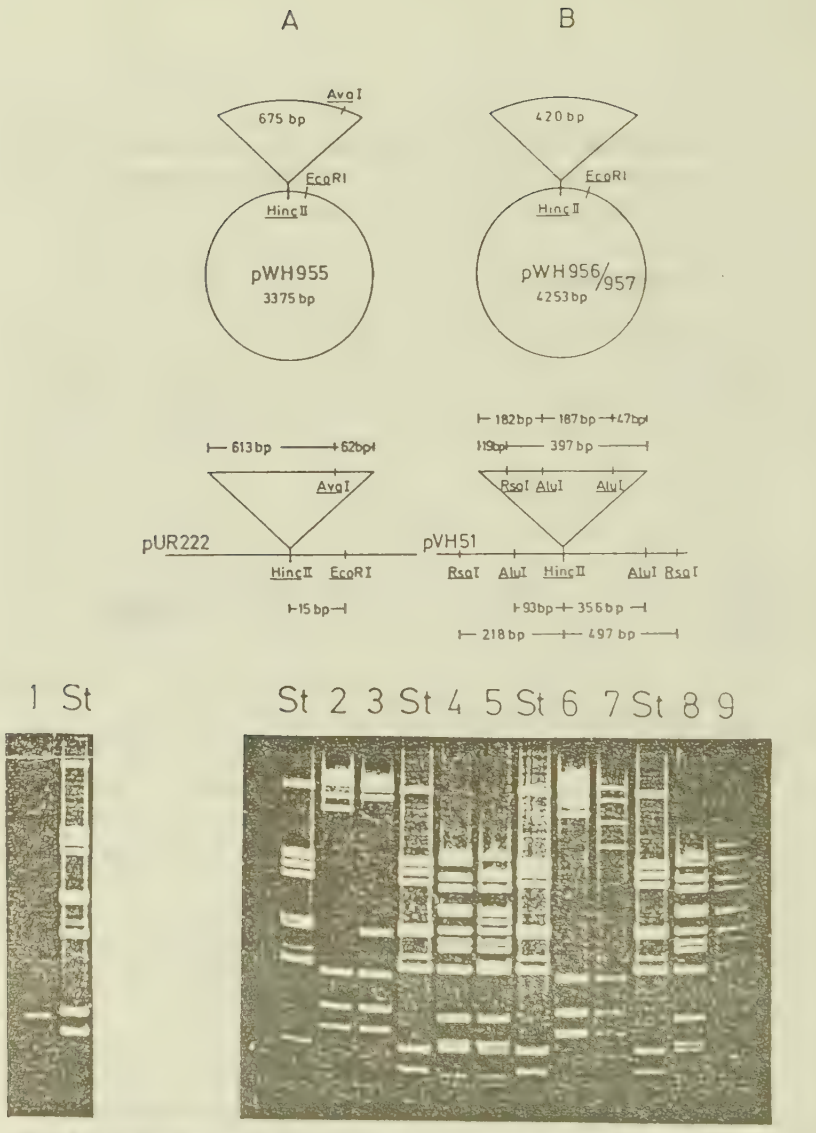


Abb. 4.2: Darstellung der zur Sequenzierung benutzten Plasmide pWH955, pWH956 und pWH957

In dem mit St gekennzeichneten Gelspuren ist als Größenstandard pVH51 HaeIII/EcoRI aufgetragen. In den Spuren 1 bis 9 sind aufgetragen: Spur 1: pWH955-EcoRI/AvaI; 2: pVH51-RsaI; 3: pWH956-RsaI; 4: pVH51-AluI; 5: pWH956-AluI; 6: pVH51-RsaI; 7: pWH957-RsaI; 8: pVH51-AluI; 9: pWH957-AluI.

pWH 956 in Spur 5 und 104 bp, 187 bp sowie 583 bp bei pWH957 in Spur 9. Damit besitzt das Plasmid pWH956 das 420 bp HincII Fragment von Tn10 in der im unteren Teil von Abb. 4.2 B aufgezeigten Orientierung.

Abbildung 4.3 zeigt die Sequenzierstrategie für die Ermittlung der 950 bp langen DNA-Sequenz von der HindIII Stelle auf Tn10 bis zum rechten IS-Element. Die Pfeile geben den jeweiligen Sequenzbereich an, der aus einem Experiment ermittelt werden konnte.

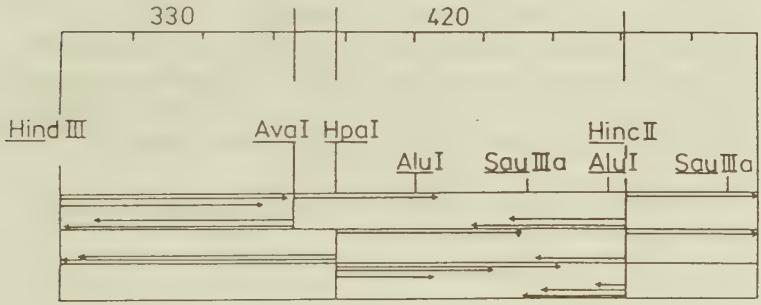


Abb. 4.3: Sequenzierstrategie für die Sequenzierung der 950 bp langen DNA-Sequenz von der HindIII Stelle auf Tn10 bis zum rechten IS Element

4.1.2 Die DNA-Sequenz

Die ermittelte DNA Sequenz (Schollmeier und Hillen, 1984) ist in Anhang I zusammen mit der DNA-Sequenz des Tetrazyklinresistenzgens (Schollmeier, Diplomarbeit Darmstadt, 1982; Hillen und Schollmeier, 1983) doppelsträngig wiedergegeben. Die Numerierung der Basenpaare erfolgt fortlaufend. Sie beginnt bei der zur einzelnen XbaI Stelle auf Tn10 benachbarten HincII Stelle. Position eins entspricht dabei dem

vierten Basenpaar der sechs Basenpaare langen Erkennungsstelle von HincII. Über der DNA-Sequenz sind die Aminosäuren der drei möglichen Leseraster nach rechts und unter der DNA die Aminosäuren der drei Leseraster nach links aufgeschrieben (Computerprogramm von Dr. G. Steger).

Die Analyse dieser Daten ergibt zwei offene Leseraster zwischen der HindIII Stelle an Position 1525 und dem rechten IS-Element (s. Abb. 4.4). Sie werden im folgenden mit orfL und orfR bezeichnet. Das Leseraster orfL begint bei Position 2047 und endet bei Position 1379 (s. Anhang I). Es hat eine Codierkapazität von 222 Aminosäuren und ist entgegengesetzt zu tetA orientiert (Hillen und Schollmeier, 1983; Wray et al., 1981). Das Leseraster orfR beginnt bei Position 2060 und endet bei Position 2476 (s. Anhang I). Es hat damit eine Codierkapazität von 138 Aminosäuren und ist in der gleichen Orientierung wie tetA angeordnet. OrfL und orfR haben damit eine entgegengesetzte Polarität und ihr Startpunkt ist nur 12 Basenpaare voneinander getrennt.

Abbildung 4.4 gibt die Anordnung der beiden Leseraster auf Tn10 im Bezug zu tetA und tetR wieder.

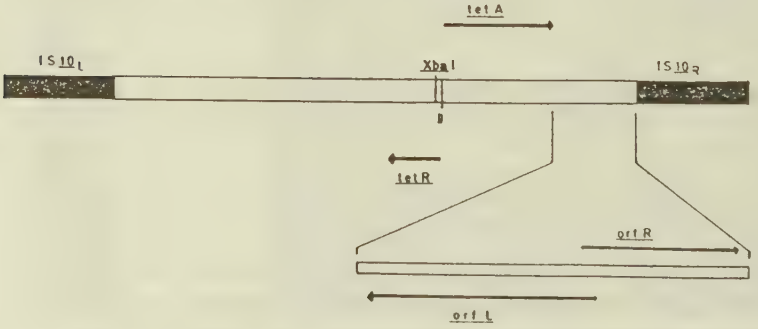


Abb. 4.4: Anordnung der Leseraster orfR und orfL im Bezug zu den Genen tetA und tetR
H = HincII

4.1.3 Restriktionskarte der DNA-Sequenz

Mit einem Computerprogramm von Dr. G. Steger wurde die DNA-Sequenz in Anhang I auf Restriktionsendonukleaseerkennungsstellen untersucht. Zugrundegelegt wurden dabei alle Restriktionsenzyme, die bis Februar 1985 käuflich waren. Die Restriktionsendonukleasen und ihre Schnittstellen sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Die Positionsangabe bezieht sich dabei auf das erste Nukleotid der Erkennungssequenz in Zählrichtung.

4.1.4 Promotoren der mRNAs für orfR und orfL

Mit der S1 Analyse sollte geklärt werden, ob die beiden offenen Leseraster orfL und orfR in vivo transkribiert werden und wo sich die Transkriptionsstartstellen befinden. Dabei wurde die DNA-Sequenz von der HindIII Stelle an Position 1525 bis zur HincII Stelle an Position 2329 untersucht. Zwei der dafür durchgeführten S1 Experimente sind in Abbildung 4.5 dargestellt.

Auf der linken Seite der Abbildung ist das Ergebnis für die orfL Orientierung aufgezeigt. Die RNA für dieses Experiment wurde aus einem E.coli Stamm isoliert, der das Plasmid pCB111 (Braus et al., 1984) trägt. Für die DNA-Probe wurde das Plasmid pRT61 mit AvaI restringiert (siehe Kap. 4.1.1), an seinen 5' Enden radioaktiv markiert und dann mit HgiAI verdaut. Das AvaI - HgiAI Fragment wurde vom Gel eluiert und zur Hybridisierung eingesetzt. Ein Teil davon wurde einer Maxam und Gilbert G+A Reaktion unterzogen und in Spur M aufgetragen. Die Endtemperatur für die Hybridisierung betrug 37°C und die S1 Behandlung wurde für 15 Minuten mit 250 U S1 durchgeführt (Spur L). Auf der rechten Seite der Abbildung 4.5 ist das Ergebnis für die orfR Orientierung aufgezeigt. Die RNA wurde dabei ebenfalls aus E.coli Zellen mit pCB111 isoliert. Für die DNA wurde das isolierte 420 bp HincII (s. Kap. 4.1.1) Fragment an seinen 5' Enden radioaktiv markiert und mit RsaI restringiert. Das größere der beiden Fragmente wurde vom Gel und für

Restriktions endonuklease	Position
Acc I	664
AflII	2037
AflIII	438, 613, 2393
AhaII	269
AhaIII	679, 1808, 1979
AluI	384, 429, 1233, 1355, 1393, 1446, 1526, 1874, 2095, 2282
AvaI	1851
BanI	269, 1826
BbvI	550, 1771
BglI	844
BglII	1855
BstEII	1835
ClaI	1206
DdeI	426, 831, 1235, 1262, 1705, 1788, 1909, 2473
EcoRI	657
EcoRV	172
FnuDII, ThaI	399, 439, 1294, 1408
Fnu4HI	400, 550, 1406, 1771, 2245, 2312
FokI	344, 778, 1152, 2104
HaeI	117, 729, 1428
HaeII	269
HaeIII, PalI	118, 358, 494, 730, 1105, 1429
HgaI	648
HgiAI	2292
HincII	1221, 1913, 2329
HindIII	1525
HinfI	1041, 2375
HpaI	1221, 1913
HpaII, MspI	1094
HphI	526, 1074, 1275, 1837
MboII	169, 857, 1347
MluI	438
MnlI	425, 1228, 1310, 1326, 2326, 2462
NarI, BdeI	269
NcoI	107
NheI	2279
NlaIII	108, 126, 789, 1218, 1465, 1970, 2014
NsiI	1478
NspBII	1407, 2243
NspCI	1464
RsaI	892, 1932, 2407
SacII, SstII	1407
Sau3IIa, MboI, DpnI	78, 375, 996, 1547, 1856, 2183, 2353, 2479
Sau96I	493, 1105
ScaI	891
SciNI, NhaI, CfoI	270, 299, 337, 718
SfaNI	103, 301, 345, 403, 687, 1630, 1752
TaqI	70, 101, 655, 1207, 2398
Tth111II	197, 1033, 1115, 1894, 2196
XhoII	1855
XmnI	444

Tabelle 4.1: Restriktionskarte der DNA-Sequenz aus Anhang 1

die Hybridisierung eingesetzt, wobei auch hier ein Teil der DNA als Größenstandard diente. Die Hybridisierbedingungen waren analog zu dem im linken Teil der Abbildung beschriebenen Experiment.

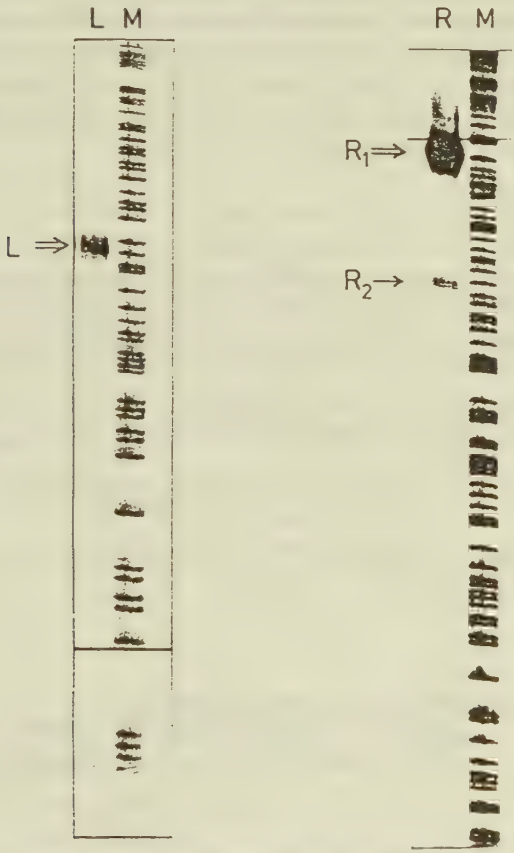


Abb. 4.5: S1 Experimente zur Ermittlung der mRNA Startstellen für orfL und orfR
Im linken Teil der Abbildung ist das Ergebnis des Experiments für die orfL - und im rechten Teil der Abbildung für die OrfR Orientierung dargestellt. In den Spuren L und R sind die entsprechenden DNA-Fragmente nach der Hybridisierung an die RNA und der S1-Behandlung aufgetragen. Die daraus resultierenden Banden sind mit L bzw. R_1 und R_2 gekennzeichnet. In den Spuren M sind als Größenstandard die Maxam-Gilbert G+A Reaktionen der entsprechenden DNA-Fragmente aufgetragen.

Für die orfL Orientierung gibt es einen mRNA Startpunkt, an Position 2002 der DNA Sequenz (s. Abb. 4.6). Für die orfR Orientierung gibt es zwei unterschiedlich starke Signale bei der S1 Analyse. Die intensivere Bande kennzeichnet einen Transkriptionsstart bei Position 1985. Die schwache, aber doch reproduzierbare Bande kennzeichnet einen Transkriptionsstart an Position 2020 der DNA-Sequenz (s. Abb. 4.6)

Die Ergebnisse der S1 Experimente sind in Abbildung 4.6 mit der DNA-Sequenz interpretiert.

Abb. 4.6: Startstellen der mRNAs von orfR und orfL
Die Startstellen der mRNAs sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Konsenssussequenzen der dazugehörenden Promotoren sind eingerahmt. Der Promotor für das schwache S1-Signal ist durch Punkte gekennzeichnet.

Alle drei in vivo gefundenen mRNAs besitzen 10 bzw. 35 Basenpaare vor ihrem 5' Ende DNA-Sequenzen, die Homologien zu E.coli Promotoren aufweisen. In Tabelle 4.2 sind die drei Sequenzen mit der Konsensussequenz für E.coli Promotoren verglichen (Siebenlist et al., 1980).

Für die Promotoren PorfL und PorfR$_1$ stimmen sowohl die beiden Hexanukleotidsequenzen, als auch ihr Abstand sehr gut mit der Konsensussequenz überein. Die hoch konservierten Nukleotide TTG der -35 Region und TANNNT der -10 Region (Siebenlist et al., 1980) sind in beiden Promotoren erhalten. Der Promotor PorfR$_2$ besitzt dagegen eine sehr schlechte -35 Region, die wahrscheinlich für die schwache Promotoraktivität verantwortlich ist. Es ist aber auch möglich, daß die kürzere mRNA von PorfR$_2$ ein Abbauprodukt von der mRNA des Promotors PorfR$_1$ ist.

Der Abstand der -10 Region vom Startnukleotid beträgt bei allen drei Promotoren vier Nukleotide (siehe Tabelle 4.2). Dies ist gegenüber der Konsensussequenz um 2-3 Nukleotide zu kurz, aber wie für den fdII' Promotor gezeigt prinzipiell möglich (Siebenlist et al., 1980). Außerdem kann das Triphosphat an der 5' Seite der mRNA den Angriff der S1 Nuklease an das Heteroduplexende beeinflussen. Die Folge davon ist die Verschiebung des tatsächlichen Startnukleotides um 1-2 Nukleotide in 5' Richtung der mRNA im S1 Experiment (Bertrand et al., 1983).

-35 Region		Abstand		-10 Region		Abstand		Start-nuklectid	
TTGACA	-	17	-	TATAAT	-	6/7	-	A	Konsensussequenz
TTGTCA	-	17	-	TACCAT	-	↳	-	A	PorfL
TTGATG	-	17	-	TAGATT	-	↳	-	A	PorfR$_1$
AACATA	-	18	-	TATCAT	-	↳	-	A	PorfR$_2$

Tabelle 4.2: Vergleich der drei Promotorsequenzen mit der E.coli Promotor-Konsensussequenz
-35 und -10 kennzeichnen die beiden Homologieregionen bei E.coli Promotoren.
PorfL steht für die mögliche Promotorsequenz in orfL Orientierung. PorfR kennzeichnet die beiden möglichen Promotorsequenzen in orfR Orientierung. 1 und 2 bezieht sich auf das starke bzw. schwache Signal im S1 Experiment.

Die Anordnung der Promotoren ist komplex. Sie liegen in einem 85 bp langen DNA Bereich. Die Transkriptionsrichtung von $PorfR_1$ und $PorfR_2$ ist divergent zu der von PorfL. Die Promotoren $PorfR_1$ und PorfL überlappen sich dabei um 26 bp. die 5'Enden ihrer mRNAs sind dadurch in den ersten 18 Basen komplementär.

Der Promotor in orfL Orientierung liegt innerhalb des offenen Leserasters von orfL. Als Initiationsstelle der Translation ist daher erst das ATG an Position 1972 möglich. Damit können von den 222 Tripletts des offenen Leserasters orfL maximal 197 exprimiert werden. Für dieses Protein errechnet sich dann ein Molekulargewicht von 22,7 kDa. Das maximal mögliche Molekulargewicht des Proteins in orfR Orientierung ist 16,7 kDa.

4.1.5 Regulation der Transkription von orfR und orfL

Aus der Nukleotidsequenz im Bereich der mRNA Startstellen für orfL und orfR ergeben sich interessante Aspekte für eine Regulation der Transkription dieser Gene . In einem Bereich von 250 bp findet man drei palindromische DNA-Sequenzen, die mögliche Bindestellen für Regulatorproteine darstellen. Diese Sequenzen sind in Abbildung 4.7 durch Balken über bzw. unter der DNA-Sequenz hervorgehoben.
In dieser Sequenz befindet sich von Position 1987 bis Position 2005 ein 19 bp langes Palindrom mit einem nicht palindromischen Basenpaar an Position zwei, gezählt vom palindromischen Zentrum. Dieses Palindrom liegt zwischen der mRNA Startstelle von orfL und der Hauptstartstelle für die mRNA von orfR. Damit ist eine Koregulation beider Gene prinzipiell möglich (siehe Abb. 4.7).

Eine zweite palindromische Sequenz befindet sich zwischen Position 1821 und 1835. Sie ist damit im Leseraster von orfL zwischen Codon 67 und 73 (siehe Abb. 4.7) und ermöglicht eine Regulation der Transkription von orfL allein. Die Anordnung eines Operators in einem Strukturgen ist schon bei dem galE Gen von E.coli gefunden worden (Fritz et al., 1983; Irani et al., 1983).

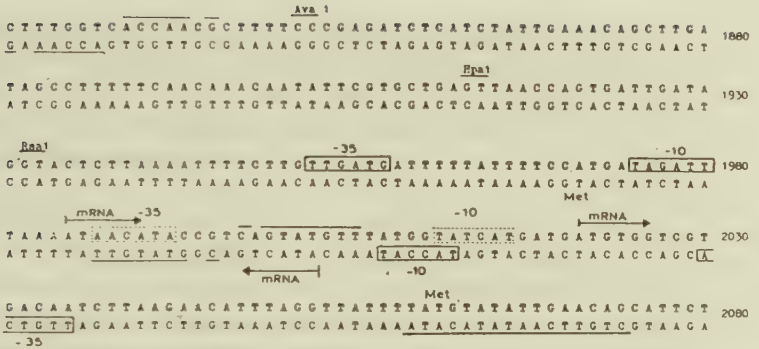


Abb. 4.7: DNA-Sequenz der Kontrollregion von orfL und orfR
-10 und -35 kennzeichnet die beiden Homologieregionen bei E.coli Promotoren Die palindromischen DNA-Sequenzen sind durch Striche über bzw. unter der DNA dargestellt. Die Startpunkte der Transkription sind durch Pfeile und die ersten möglichen Startpunkte der Translation durch ein Methionin gekennzeichnet.

Die dritte mögliche regulatorische Sequenz befindet sich genau am Beginn des offenen Leserasters von orfR zwischen Position 2060 und 2074. Diese Sequenz ist der Konsensussequenz für die DNA-Bindestelle des LexA Proteins sehr ähnlich (Ebina et al., 1983).

5' C T G T A T A T N N A N N C A G 3' Lex A Operator

5' A T G T A T A T T G A A C A G 3' Tn10 Sequenz

Abb. 4.8: Vergleich der LexA Operatorsequenz mit der Tn10 Sequenz von Position 2060 bis 2074
Die Nukleotide an den mit einem N gekennzeichneten Positionen der LexA Operator Konsensussequenz sind beliebig.

Der Vergleich in Abbildung 4.8 zeigt, daß bis auf das erste Nukleotid alle konservierten Sequenzen homolog sind. Der Tn10 Sequenz fehlt allerdings das unspezifische Nukleotid an Position 13, so daß bei Tn10 der Abstand der beiden Homologieblöcke um ein bp verkürzt ist. Diese Sequenz ermöglicht eine Regulation der Transkription nur von orfR.

Um eine Aussage über die Regulation der Gene orfL und orfR machen zu können, wurden die S1-Experimente mit mRNA-Präparationen von verschiedenen recombinanten E.coli Stämmen durchgeführt. Wurde eine RNA Präparation aus einem E.coli Stamm benutzt, der das Plasmid pWH956 (s. Kap. 4.1.1) besitzt, wurden beide Gene transkribiert. Dieses Plasmid besitzt noch die ersten 19 Codons des Leserasters von orfL und 91 Codons des Leserasters von orfR. Wurde ein E.coli Stamm mit einem Plasmid benutzt, das den rechten Teil des Tn10 von der HindIII Stelle (Position 1525) bis zum Ende des rechten IS-Elementes besitzt (pCB111, Brans, et al., 1984), wurden ebenfalls beide Gene transkribiert. Bei dem Plasmid pCB111 ist das Leseraster von orfR intakt. Für das Leseraster von orfL ergibt sich eine Fusion an Codon Nummer 149.

Das heißt, wird das Gen orfR translatiert, hat das Genprodukt unter diesen experimentellen Bedingungen keine Regulatorfunktion bei der Transkription von orfL und orfR. Für das Genprodukt von orfL kann mit den hier untersuchten Deletionen der Tn10 DNA keine endgültige Aussage über eine mögliche Repressoraktivität gemacht werden.

4.1.6 Biologische Funktion der von orfR und orfL codierten Proteine

Für die biologische Funktion der von orfL und orfR codierten Proteine, gibt es mehrere Hinweise aus der Literatur (Shales et al., 1980; Wray et al. 1981; Yang et al. 1976, Zupancic et al., 1980). Da das Antibiotikum Tetrazyklin an die Ribosomen bindet und die Translation inhibiert (Hierowski, 1965), wird neben dem aktiven Transport des Tetrazyklins aus der Zelle (McMurry et al., 1980) als weiterer Resistenzmechanismus eine Desensibilisierung der Ribosomen diskutiert (Shales et al., 1980). Vorstellbar wäre dabei der Austausch des ribo-

somalen Proteins, das für die Tetrazyklinbindung verantwortlich ist, gegen ein zweites ähnliches Protein, welches das Antibiotikum nicht mehr bindet. Aus diesem Grunde wurden die Aminosäuresequenzen von orfL und orfR mit den Sequenzen aller ribosomalen Proteine von E.coli verglichen. Die Untersuchungen wurden bei Dr. B. Wittmann-Liebold in Berlin durchgeführt. Die benutzten Computerprogramme "PM2 VGL" und "PM3 VGL" hatten eine Suchlänge von 10 Aminosäuren. Die Suchgenauigkeit betrug dabei vier identische Aminosäuren und mindestens drei nur durch einen Nukleotidaustausch in ihrer Information veränderte Codons innerhalb der 10 Aminosäuren. Unter diesen Bedingungen konnte keine Homologie zwischen den Aminosäuresequenzen von orfL, orfR und den Sequenzen der ribosomalen Proteine von E.coli gefunden werden.

Weiter wurde untersucht, ob eines der beiden Proteine Repressorfunktionen haben könnte, und damit eine DNA-Bindedomäne besitzt (siehe auch Diskussion der Deletionen in Kap. 4.1.5). Deshalb wurden die Aminosäuresequenzen von orfL und orfR mit den Aminosäuresequenzen von tetR (Postle et al., 1984), lexA (Hovii et al., 1981) und den DNA Bindedomänen weiterer Repressoren (Pabo und Sauer, 1984; Kelley und Yanofsky, 1985) verglichen. Auch hier konnte keine Homologie festgestellt werden.

Zusammenfassend muß man daher sagen, daß es zur Zeit noch keinen Hinweis auf die biologische Funktion dieser Proteine gibt.

4.1.7 Ausnutzung der verschiedenen Codons für die Tn10 codierten Proteine

In Tabelle 4.3 ist die Codon-Benutzung von orfL und orfR im Vergleich zu tetA (Hillen und Schollmeier, 1983) und tetR (Postle et al., 1984) dargestellt. Daraus ergibt sich kein auffallender Unterschied zwischen den vier Genen, obwohl der durchnittliche A/T Gehalt der DNA-Sequenz von tetA und tetR mit 58% um 10% unter dem A/T Gehalt der DNA-Sequenz von orfL und orfR liegt. Im folgenden werden deshalb die vier Gene gemeinsam betrachtet.

		orfL	orfR	tetA	tetR			orfL	orfR	tetA	tetR
Phe	UUU	8	6	22	7	Ala	GCU	3	4	14	6
	UUC	0	1	6	2		GCC	6	0	5	5
Leu	UUA	6	6	23	18		GCA	2	2	13	5
	UUG	5	4	13	4		GCG	2	3	9	0
	CUU	7	2	11	3	Tyr	UAU	7	9	4	3
	CUC	2	0	2	4		UAC	3	1	3	0
	CUA	1	1	4	3	His	CAU	5	3	3	6
	CUG	1	3	7	1		CAC	1	1	2	3
Ile	AUU	10	4	22	2	Gln	CAA	10	5	8	9
	AUC	7	4	10	3		CAG	1	4	6	3
	AUA	4	0	5	1	Asn	AAU	9	5	9	5
Met	AUG	4	2	13	3		AAC	6	1	1	2
Val	GUU	3	4	8	0	Lys	AAA	19	10	6	10
	GUC	1	1	4	2		AAG	3	3	3	2
	GUA	1	1	6	4	Asp	GAU	9	7	8	7
	GUG	3	1	8	2		GAC	0	0	1	1
Ser	UCU	1	3	4	2	Glu	GAA	9	4	7	14
	UCC	0	1	0	0		GAG	3	3	3	7
	UCA	3	0	9	1	Cys	UGU	1	0	1	2
	UCG	1	0	7	0		UGC	0	0	0	4
	AGU	4	1	9	5	Arg	CGU	0	5	5	2
	AGC	3	1	2	3		CGC	1	1	2	1
Pro	CCU	2	0	5	4		CGA	1	1	1	1
	CCC	0	0	3	0		CGG	0	2	1	2
	CCA	0	1	5	2		AGA	0	1	1	2
	CCG	0	0	1	1		AGG	0	1	0	2
Thr	ACU	2	1	4	5	Gly	GGU	4	1	13	6
	ACC	2	1	9	1		GGC	4	0	9	1
	ACA	3	5	6	5		GGA	1	0	8	3
	ACG	0	3	6	0		GGG	0	1	9	3
Trp	UGG	3	3	12	2						

Tabelle 4.3: Codon Benutzung der Proteine von orfL und orfR im Vergleich zu tetA und tetR

Ihre Codon-Benutzung ist nicht über alle möglichen Tripletts gleichmäßig verteilt. So wird bei der Aminosäure Phenylalanin 43 mal das Codon UUU und nur 9 mal das Codon UUC benutzt. Ähnliches hat man bei den Genen des Transposons Tn3 gefunden (Heffron et al., 1979; Grantham et al., 1980). Weiterhin findet man deutliche Unterschiede in der Codon-Benutzung bei den Aminosäuren Tyrosin (23 mal UAU gegenüber

7 mal UAC), Glutamin (32 mal CAA gegenüber 14 mal CAG), Asparagin (28 mal AAU gegenüber 10 mal AAC) und Lysin (45 mal AAA gegenüber 11 mal AAG).

Vergleicht man diese Daten mit den Untersuchungen von Grosjean und Fiers (1982) über die Expression von MS2 RNA und E.coli mRNAs, so muß man aufgrund der Codon-Benutzung alle vier Gene zu den schwach exprimierten Genen in E.coli zählen.

Betrachtet man sich jetzt noch die variable dritte Position des Nukleotidtripletts, so stellt man fest, daß die Basen A und T gegenüber den Basen G und C bevorzugt werden. So wird bei den Codons, die in ihrer "wobble" Position nur T und C besitzen in 79% aller Fälle das T benutzt. Bei den Codons mit A oder G in der "wobble" Position wird zu 73% das A benutzt. Bei den Tripletts die alle 4 Nukleotide in ihrer variablen Position erlauben, ist die Verteilung 34% T, 28% A, 20% C und 18% G.

4.2 Termination der Transkription von tetA und orfL

Aus der genetischen Anordnung von tetR, tetA, orfL und orfR auf Tn10 (siehe Abb. 4.9) ergibt sich, daß die Gene tetA und orfL aufeinander zulaufen. Das offene Leseraster von tetA endet dabei an Position 1266 und das offene Leseraster von orfL an Position 1379 der Tn10 Sequenz (siehe Anhang I). Auf der 112 bp langen Sequenz zwischen den beiden Translationsstopcodons befindet sich eine DNA-Sequenz, die der Konsensussequenz eines Transkriptionsterminators entspricht (Hillen und Schollmeier, 1983; Rosenberg und Court, 1979). Dieser Sequenzabschnitt ist in Abbildung 4.9 mit einem T gekennzeichnet und seine mögliche mRNA Sekundärstruktur ist an Hand der DNA-Einzelstränge in Abbildung 4.10 dargestellt.

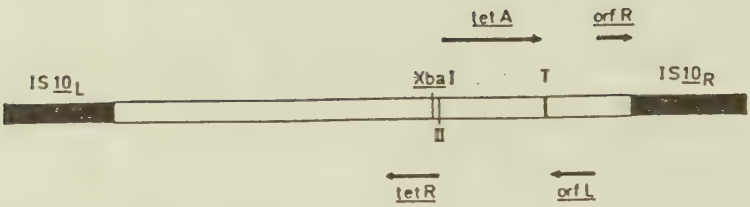


Abb. 4.9: Anordnung der Gene tetR, tetA, orfL und orfR auf Tn10

Betrachtet man den mRNA ähnlichen Strang (s. Abb. 4.10) in Transkriptionsrichtung von tetA (tetA Orientierung), entspricht er mit einem G/C reichen Stamm, einer 6 Basen langen Schleife und sechs T's in Folge auf der 3' Seite der Stamm-Schleifen-Sekundärstruktur, einem typischen rho unabhängigen Transkriptionsterminator (Rosenberg und Court, 1979). Für die Transkriptionsrichtung von orfL (orfL Orientierung) findet man an der 3' Seite dieser Sekundärstruktur sieben T's innerhalb der ersten elf Nukleotide. Obwohl die meisten Transkriptionsterminatoren ein 5-8 Nukleotide langes perfektes oligo T-Stück besitzen sind einige Beispiele bekannt bei denen auch ohne ein perfektes oligo T-Stück die Transkription abbricht (Brendel und Trifonov 1984). Somit könnte diese DNA-Sequenz als bidirektionaler Transkriptionsterminator fungieren. Dadurch wäre eine überlappende Transkription von tetA und orfL verhindert da ansonsten die entstehenden mRNAs dieser Gene komplementär werden würden. Für die Komplementarität solcher mRNAs wurde gezeigt, daß sie einen negativen Einfluß auf die Translation ausüben (Mizuno et al., 1984).

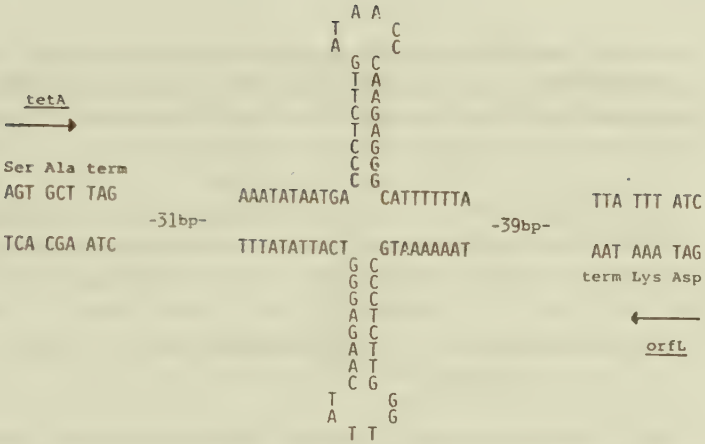


Abb. 4.10: Darstellung der Tn10 DNA-Sequenz von Position 1258 bis 1387
Die mögliche mRNA Sekundärstruktur dieser Sequenz ist an Hand der DNA-Einzelstränge aufgezeigt.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte nun die Frage beantwortet werden, ob die DNA-Sequenz zwischen den Translationsstopcodons von tetA und orfL Transkriptionsterminatoraktivität in beiden Richtungen besitzt und, wenn ja, ob diese Aktivität durch die Stamm-Schleifen-Sekundärstruktur ausgelöst wird?

Zur Klärung der ersten Frage wurde ein entsprechendes DNA-Fragment von Tn10, das diese Sequenz enthält, in zwei unterschiedlichen Meßsystemen auf Terminatoraktivität untersucht. Dabei wurde zum einen die Reduktion der ß-Galaktosidaseaktivität des E.coli Stammes CSH26 gemessen, der dieses Fragment in beiden Orientierungen auf einem Plasmid zwischen dem tet-Promotor P_A und dem lacZ Strukturgen von pRT405 besitzt (s. Kap. 4.2.2). In einem zweiten unabhängigen Meßsystem wurde die Reduktion der Galaktokinaseaktivität des E.coli Stammes N100 bestimmt, der das Terminatorfragment in beiden Orientierungen auf einem Plasmid zwischen dem gal Promotor und dem galK Strukturgen von pDS26t

besitzt (s. Kap 4.2.3). Die Messungen wurden deshalb in zwei unterschiedlichen Systemen durchgeführt, damit ein Einfluß der neu insertierten und auch transkribierten DNA auf die Translation des nachfolgenden Gens weitestgehend ausgeschlossen werden kann.

Um den zweiten Teil der oben angesprochenen Frage zu beantworten, sollte bei einer gefundenen Terminatoraktivität der jeweilige Endpunkt der mRNA durch einer S1 Analyse bestimmt werden (Kap. 4.2.4).

4.2.1 Klonierung des 324 bp HaeIII Terminatorfragments von Tn10 in pRT 405 und pDS26t

Um die Terminatoraktivität der DNA-Sequenz zwischen den Translationsstopcodons von tetA und orfL zu bestimmen, wurde ein DNA-Fragment, das diese Sequenz enthält, in geeignete Plasmide kloniert (McKenney et al., 1981; Wray, Munson und Reznikoff, pers. Mitteilung). Als DNA-Fragment wurde das 324 bp lange HaeIII Fragment von Tn10 benutzt (von Position 1105 bis 1429, siehe Angang I). Um dieses Fragment zu erhalten, wurde das Plasmid pRT61 (Jorgensen und Reznikoff, 1979) mit HaeIII verdaut, die Reaktionsprodukte auf einem 5% Polyacrylamidgel aufgetrennt und das 324 bp lange DNA-Fragment vom Gel eluiert (s. Abb. 4.11, Spur 1). Insertiert wurde dieses Fragment in die einzelne SalI Stelle zwischen dem Promotor und dem lacZ Strukturgen von pRT405 (Wray, Munson und Reznikoff, pers. Mitteilung).

Die 5' überstehenden Enden des SalI linearisierten Vektors pRT405 wurden zuerst dephosphoryliert, um bei der Ligation eine Religierung des Vektors zu unterdrücken. Anschließend wurden die SalI Enden des Vektors aufgefüllt und dann mit dem 324 bp HaeIII Fragment glattendig ligiert. Die Ligationsprodukte wurden in E.coli CSH26 transformiert und diese auf McConkey Agarplatten mit Amplicillin (60 mg/l) selektioniert. Dabei konnten zwei Typen von Klonen beobachtet werden. Einmal Kolonien die 48 Stunden weiß blieben und dann langsam rosa wurden. Zum zweiten welche, die nach 12 Stunden Wachstum rosa Kolonien ergaben und nach 48 Stunden rot waren. Von beiden Typen wurden einige Klone präpa-

riert und mit den Restriktionsendonukleasen SalI und ClaI verdaut. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte auf einem 5% Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Auftauchen eines 324 bp langen DNA-Fragments bei der SalI Verdauung bewies die erfolgreiche Insertion des 324 bp HaeIII Fragments unter Rekonstruktion zweier SalI Stellen (siehe Abb. 4.11, Spur 2+3). Die Orientierung des insertierten DNA-Fragments wurde durch eine ClaI Verdauung untersucht (siehe Abb. 4.11, Spur 4-6). Die Restriktionsstelle ClaI liegt an Position 1206 der DNA Sequenz (siehe Anhang I) und damit asymmetrisch in dem 324 bp HaeIII Fragment. In dem Vektor pRT405 befindet sich nur eine CalI Erkennungsstelle, und zwar am Anfang des Strukturgens von lacZ (Wray, pers. Mitteilung). Daraus ergibt sich bei der ClaI Verdauung für die tetA Orientierung (Transkriptionsrichtung von tetA und lacZ gleich) ein um 122 bp längeres ClaI Fragment als für die orfL Orientierung (Transkriptionsrichtung von orfL und lacZ gleich). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.11 A zusammengefaßt.

Das Plasmid pWH951 (s. Abb. 4.11 A) besitzt das 324 bp HaeIII Fragment zwischen zwei SalI Stellen in tetA Orientierung. E.coli CSH26 transformierte Zellen wachsen mit diesem Plasmid als weiße Kolonien auf Lactose McConkey Agarplatten und färben sich erst nach 48 Stunden rosa.

Das Plasmid pWH961 (s. Abb. 4.11 A) besitzt das DNA Fragment zwischen zwei SalI Stellen in orfL Orientierung und die Klone mit diesem Plasmid haben nach 12 Stunden auf Lactose McConkey Agarplatten eine rosa Färbung und sind nach 48 Stunden rot.

Für eine unabhängige Messung der Terminatorstärke dieser DNA-Sequenz wurde das 324 bp HaeIII Fragment auch in die einzelne SmaI Stelle zwischen dem gal Promotor und dem galK Strukturgen von pDS26t kloniert. Der SmaI linearisierte Vektor wurde dabei dephosphoryliert, glattendig mit dem 324 bp HaeIII Fragment ligiert und in E.coli N100 transformiert. Die transformierten E.coli Zellen wurden dann auf McConkey Agarplatten mit 1% Galaktose und 60 mg/l Ampicillin selektio-

niert. Eine unterschiedliche Färbung der Kolonien, wie bei dem lacZ System, konnte nicht beobachtet werden. Vielmehr waren alle Kolonien nach einer Wachstumszeit von 14 Stunden gleich rot gefärbt. Zur Bestimmung der Insertion wurden einige Klone präpariert und mit der Restriktionsendonuklease TaqI auf Insertion und Orientierung des 324 bp HaeIII Fragmentes untersucht (s. Abb. 4.11, Spur 7-9). Bei Insertion des DNA Fragments verschwindet das 620 bp TaqI Fragment des Vektors (W. Schumann, pers. Mitteilung), und es entstehen zwei neue Fragmente. Im Falle der tetA Orientierung sind die beiden neuen DNA Fragmente 318 bp und 626 bp lang, bei der orf1 Orientierung 438 bp und 506 bp (s. Abb. 4.11, Spur 8+9). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.11 B zusammengefaßt.

Das Plasmid pWH952 trägt das 324 bp HaeIII Fragment in tetA Orientierung. Das Plasmid pWH962 trägt das 324 bp HaeIII Fragment in orf1 Orientierung.

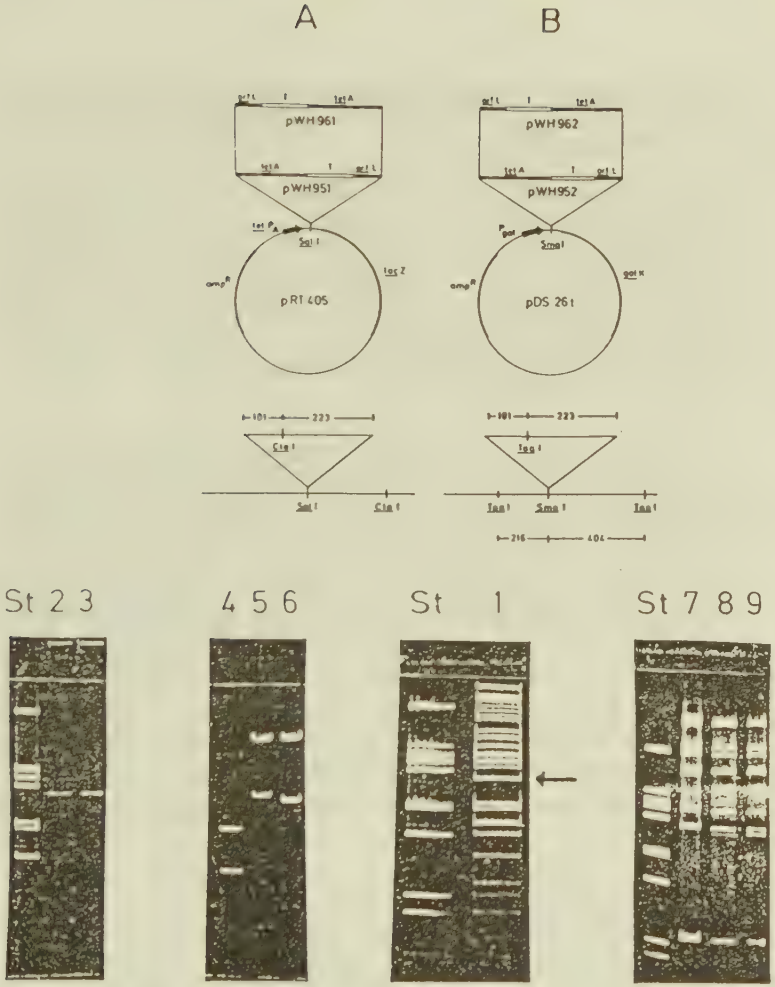


Abb. 4.11: Insertion und Orientierung des 324 bp HaeIII Fragments von pRI61 in pRI405 und pDS26t

In den mit St gekennzeichneten Spuren ist als Größenstandard pVH51-HaeIII/EcoRI aufgetragen. In den Spuren 1 bis 9 sind aufgetragen: 1: pRI61-HaeIII; 2: pWH951-SalI; 3: pWH961-SalI; 4: Längenstandard 1000 bp und 1450 bp; 5: pWH951-ClaI; 6: pWH961-ClaI; 7: pDS26t-TaqI; 8: pWH962-TaqI; 9: pWH952-TaqI.

4.2.2 Bestimmung der ß-Galaktosidaseaktivität von E.coli CSH26/pWH951 und E.coli CSH26/pWH961

Um die Stärke der Transkriptionstermination des 324 bp HaeIII Fragmentes zu bestimmen wurde die Enzymaktivität der ß-Galaktosidase in dem E.coli Stamm CSH26 mit den Plasmiden pWH951 und pWH961 gemessen (s. Kap. 3.19). Als Vergleich wurden die Plasmide pRT405 und pRZ5202 benutzt. pRT405 gibt die maximale ß-Galaktosidaseaktivität an und pRZ5202, das dem Plasmid pRT405 ohne lacZ Gen entspricht, liefert den Hintergrund im Experiment.

In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse des Enzymtests aufgelistet. Mit dem Plasmid pRT405 wurde eine maximale ß-Galaktosidaseaktivität von 1713 Units gemessen. Der E.coli Stamm CSH26 mit dem Plasmid pRZ5202 lieferte nur noch 0,5% dieser Aktivität. Die Insertion des 324 bp HaeIII Fragments in tetA Orientierung (pWH951) lieferte noch 1,2% oder 21 Units der maximal möglichen Enzymaktivität. Das Plasmid pWH961 mit der orfL Orientierung des Terminatorfragments besaß noch 6,7% oder 118 Units ß-Galaktosidaseaktivität. Dies zeigt, daß das 324 bp HaeIII Fragment Transkriptionsterminatoraktivität in beiden Richtungen besitzt. Die Terminatorstärke ist aber unterschiedlich, denn mit dem DNA-Fragment in orfL Orientierung (pWH961) wurde eine 5-fach höhere ß-Galaktosidaserestaktivität gemessen als mit der tetA Orientierung in pWH951.

Plasmide	ß-Galaktosidase-aktivität	Standard-abweichung	% des Maximums
pRT405	1713	64	100,0
pRZ5202	8	1	0,5
pWH951	21	4	1,2
pWH961	118	17	6,7

Tabelle 4.4: Ergebnisse des ß-Galaktosidaseaktivitätstests
Die ß-Galaktosidaseaktivität ist in Units nach Miller angegeben (Miller, J.H., 1972).

4.2.3 Bestimmung der Galaktokinaseaktivität von E.coli N100/pWH952 und E.coli N100/pWH962

Um die Stärke der Transkriptionstermination des 324 bp HaeIII Fragments von Tn10 in zwei unabhängigen Experimenten zu bestimmen, wurde die Enzymaktivität der Galaktokinase mit den Plasmiden pWH952 und pWH962 in dem E.coli Stamm N100 gemessen (s. Kap. 3.20). Die maximale Enzymaktivität der Galaktokinase wurde mit dem Ausgangsplasmid pDS26t in N100 bestimmt. Zur Ermittlung des Hintergrundes im Experiment wurde der E.coli Stamm N100 alleine betrachtet. Die Ergebnisse dieses Enzymtests sind in Tabelle 4.5 aufgelistet. Mit pDS26t wurden 427 Units galK Aktivität gemessen. Die Zellen alleine ohne Plasmid hatten noch 2 Units Galaktokinaseaktivität. Die Insertion des 324 bp HaeIII Fragments in tetA Orientierung bei pWH952 reduzierte die Enzymaktivität auf 18 Units oder 4,2%. Die umgekehrte Orientierung bei pWH962 besaß noch 96 Units oder 22,5% Galaktokinaseaktivität. Das heißt, daß das 324 bp HaeIII Fragment im Galaktokinasetest auch eine bidirektionale Terminatoraktivität zeigt, die aber in der tetA Orientierung um den Faktor fünf stärker ist als in der orfL Orientierung.

Plasmid	Galaktokinase-aktivität	Standard-abweichung	% des Maximuns
pDS26t	427	59,8	100,0
kein	2	0,6	0,5
pWH952	18	3,3	4,2
pWH962	96	5,7	22,5

Tabelle 4.5: Ergebnisse des Galaktokinaseaktivitätstests
Für die Units der Galaktokinaseaktivität siehe Kap. 3.20.

Vergleicht man jetzt die Ergebnisse der beiden unabhängigen Enzymtests miteinander, so zeigt sich, daß eine Insertion des 324 bp HaeIII Fragments von Tn10 in beiden Orientierungen immer eine Reduktion der Expression des entsprechenden Indikatorgens bewirkt. Die Restenzymaktivität ist bei pWH952 und pWH962 (orfL Orientierung) aber um das 5-fache höher als der entsprechende Wert bei pWH951 und pWH961 (tetA

Orientierung). Das heißt, daß der relative Unterschied der Terminatorstärke der beiden Orientierungen in den zwei Meßsystemen gleich ist. Die Absolutwerte der verbleibenden Enzymaktivitäten sind aber im Galaktokinasetest um den Faktor 3,5 höher als im ß-Galaktosidasetest.

4.2.4 3' Endpunkte der mRNAs

Um die in Kapitel 4.2.2 und 4.2.3 gemessene Termination der Transkripion des 324 bp HaeIII Fragments von Tn10 einer bestimmten Sequenz auf diesem Fragment zuordnen zu können, sollten nun die 3'Enden der mRNAs mit der S1 Analyse bestimmt werden.

Für das tetA Gen wurde die RNA von E.coli CSH26 mit pWH951 präpariert und mit dem BamHI-HindIII-Fragment von pWH951 hybridisiert. Die BamHI Schnittstelle liegt sechs bp vor der SalI-Erkennungsstelle, also zwischen dem $tetP_A$-Promotor und dem insertierten 324 bp DNA-Fragment. Die HindIII Erkennungsstelle liegt 14 bp hinter der SalI Stelle in Richtung lacZ-Strukturgen (siehe auch Abb. 4.11). Beide Restriktionsendonukleaseerkennungsstellen kommen auf pWH951 nur einmal vor.

Für die Hybridisierung wurde das Plasmid pWH951 mit BamHI linearisiert und an seinen 3' Enden mit $\alpha\,^{32}P$ dATP unter Zugabe eines 200-fach molaren Überschusses an dGTP radioaktiv markiert. Anschließend wurde das lineare Plasmid mit HindIII geschnitten und das 344 bp lange DNA-Fragment auf einem 5% Polyacrylamidgel von dem Vektor getrennt und für die Hybridisierung eluiert. Die Hybridisierung wurde wie in Kapitel 3.10.2 beschrieben durchgeführt. Die Endtemperaturen wurden dabei zwischen 37°C und 28°C variiert und das Hybrid mit 20 bis 250 Units S1 behandelt. Das Experiment ist in Abbildung 4.12 auf der linken Seite dargestellt. In Spur tetA ist die radioaktiv markierte DNA nach Hybridisierung und S1-Behandlung aufgetragen. Die Endtemperatur der Hybridisierung betrug dabei 37°C und die eingesetzte S1 Menge 250 Units. Spur M zeigt eine Maxam-Gilbert G+A Reaktion des gleichen DNA-Fragments als Längenstandard. Das Experiment zeigt ein Terminationssignal für die Transkriptionsrichtung von tetA an Position 1332

der Tn10 DNA-Sequenz. Der Terminationspunkt befindet sich damit genau zwei Nukleotide hinter der beschriebenen möglichen mRNA-Sekundärstruktur (s. Abb. 4.13). Überraschend war dabei die Tatsache, daß der Endpunkt der mRNA vor dem oligo dT liegt und nicht, wie für Transkriptionsterminatoren üblich, am Ende des Oligo dT Stückes (Brendel und Trifonov, 1984). Um eine mögliche Instabilität der dA-rU Basenpaare am Ende des mRNA-DNA-Hybrids auszuschließen wurde die Endtemperatur der Hybridisierung, zwischen 37°C und 28°C variiert. Diese Veränderung hatte aber keinen Einfluß auf die Länge des verbleibenden DNA-Fragments bei dem S1 Experiment.

Für die Bestimmung des mRNA Endes von orf1 wurde analog zu dem oben beschriebenen Experiment E.coli CSH26/pRT961 benutzt. Hierbei ergaben die verschiedenen RNA Präparationen nicht reproduzierbare Ergebnisse. Deshalb wurde die RNA von E.coli N100/pWH962 präpariert und mit dem HindIII-TaqI Fragment von pWH962 hybridisiert. Die Restriktionserkennungsstelle HindIII liegt 18 bp vor der SmaI-Stelle, also zwischen dem gal-Promoter und dem insertierten 324 bp HaeIII Fragment. Die TaqI Erkennungsstelle liegt an Position 1207 der Tn10 DNA-Sequenz und damit 80 bp hinter dem möglichen Transkriptionsterminator ausgehend von der Transkriptionsrichtung in pWH962 (siehe auch Abb. 4.11 B). Die Restriktionsendonukleaseerkennungsstelle für HindIII kommt auf pWH962 nur einmal vor.

Für die Hybridisierung wurde das Plasmid pWH962 mit HindIII linearisiert und an seinen 3' Enden mit α^{32}P dATP unter Zugabe eines 200-fach molaren Überschusses an dTTP radioaktiv markiert. Anschließend wurde das lineare Plasmid mit TaqI geschnitten, das 438 bp HindIII-TaqI Fragment nach der Gelelektrophorese von dem 5% Polyacrylamidgel eluiert und zur Hybridisierung eingesetzt. Die Hybridisierung wurde wie in Kapitel 3.10.2 beschrieben durchgeführt. Die Endtemperaturen wurden dabei zwischen 37°C und 28°C variiert und das Hybrid mit 20 bis 250 Units S1 behandelt. Das Ergebnis des S1-Experiments ist in Abb. 4.12 auf der rechten Seite dargestellt. In Spur orf1 ist das radioaktiv markierte DNA-Fragment nach Hybridisierung und S1 Behandlung

aufgetragen. Die Endtemperatur der Hybridisierung betrug dabei 37°C und die eingesetzte S1 Menge 250 Units. Spur M zeigt eine Maxam-Gilbert G+A Reaktion des gleichen DNA-Fragments als Längenstandard.

Abb. 4.12: S1 Experiment zur Bestimmung der mRNA Endpunkte von tetA (links) und orfL (rechts)

Das gefundene Terminationssignal in Transkriptionsrichtung von orfL liegt an Position 1305 der Tn10 DNA-Sequenz, und damit genau drei Nukleotide hinter der beschriebenen mRNA Sekundärstruktur (s. Abb. 4.13). Die Ergebnisse der S1-Experimente sind in Abbildung 4.13 zusammengefaßt.

Abb. 4.13: DNA-Sequenz des bidirektionalen Transkriptionsterminators auf Tn10
Die Endpunkte der mRNAs sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Mit diesen Experimenten ist gezeigt, daß die in Kap. 4.2.2 und 4.2.3 gemessene Terminatoraktivität des 324 bp HaeIII-Fragments von Tn10 auf die in Abbildung 4.13 dargestellte Sequenz zurückzuführen ist. Die Endpunkte der mRNAs liegen dabei bis auf ein bp genau symmetrisch zu der palindromischen Sequenz des Transkriptionsterminators. Eine Veränderung der Hybridisiertemperatur zwischen 28°C und 37°C im S1 Experiment hat keinen Einfluß auf diese Endpunktsbestimmung.

Damit ist gezeigt, daß die DNA-Sequenz von Tn10 zwischen Position 1300 und 1337 einen bidirektionalen Transkriptionsterminator darstellt.

4.3 Tn10 Tet-Repressor - tet-Operator Wechselwirkung

Das Tetrazyklinresistenzoperon auf Tn10 besteht aus zwei Genen, dem Tetrazyklinresistenzgen tetA und dem Tetrazyklinrepressorgen tetR. Beide Gene sind koreguliert und starten an einer gemeinsamen Startregion mit entgegengesetzter Polarität, ausgehend von sich überlappenden Promotoren (Levy und McMurray, 1974; Levy et al., 1977; Wray et al., 1981; Jorgensen und Reznikoff, 1979; Hillen et al., 1984). In dieser Startregion überlappend zu den Promotoren gibt es zwei palindromische DNA-Sequenzen, die mögliche Bindestellen für das Regulatorprotein darstellen (s. Abb. 4.14).

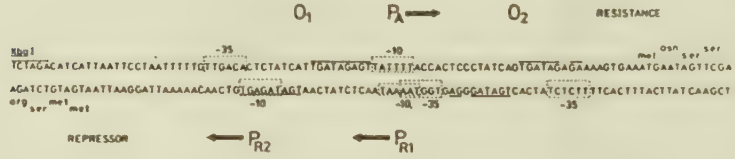


Abb. 4.14: DNA-Sequenz der Tn10 tet Kontrollregion
Die durch in vitro Transkriptionsexperimente gefundenen Promotoren sind durch Pfeile gekennzeichnet (Hillen et al., 1984). Die DNA-Sequenzen der -10 und -35 Region sind eingerahmt. Die beiden palindromischen DNA-Sequenzen O_1 und O_2 sind durch Balken über bzw. unter dem DNA Doppelstrang gekennzeichnet. Weiterhin sind die ersten 4 Aminosäuren des Tet-Repressors links und die des Resistenzproteins rechts eingezeichnet.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wo das Tet-Repressorprotein an die Kontrollregion des Tetrazyklinresistenzoperons bindet. Dafür wurden DNaseI Schutzexperimente durchgeführt. Der benötigte Tet-Repressor war isoliert und stand in ausreichenden Mengen zur Verfügung (Hillen et al., 1982; Oehmichen et al., 1984). Alle hier beschriebenen

DNaseI Schutzexperimente wurden mit DNA-Konzentrationen von 10^{-9} M durchgeführt.

4.3.1 DNaseI-Footprint von der Tn10 tet-Operator-DNA mit dem Tn10 Tet-Repressor

Für die DNaseI-Schutzexperimente mit Tn10 Operator-DNA wurde das 187 bp lange EcoRI Fragment von pWH106 benutzt (Hillen et al., 1982). Dieses Fragment beinhaltet die Tn10 Sequenz von der AluI Stelle im tetR Gen (Postle et al., 1984; Position -63 ausgehend von der DNA-Sequenz in Anhang I) bis zu der HaeIII Stelle im Tetrazyklinresistenzgen (Position 118, s. Anhang I).

Das DNA-Fragment wurde an seinen 5'Enden radioaktiv markiert und dann entweder mit HhaI (Position -54) oder mit Sau3a (Position 78) restringiert. Die entstandenen Operatorfragmente mit nur noch einem radioaktiv markierten Ende wurden nach der Auftrennung auf einem 5% Polyacrylamidgel und der anschließenden Gelelution für die Schutzexperimente eingesetzt. Abbildung 4.15 und 4.16 zeigen die "DNaseI Footprinting" Experimente des Tn10 Operator-Plus- und Minusstranges mit dem Tn10 Tet-Repressor.

Die Ergebnisse aus den Experimenten in Abbildung 4.15 und 4.16 zeigen, daß zwei DNA-Abschnitte auf jedem der beiden Stränge in Anwesenheit des Tet-Repressors vor der Verdauung durch DNaseI geschützt sind. Zwischen diesen beiden geschützten Bereichen sind jeweils 5-6 Phosphodiesterbindungen für die DNaseI zugänglich. Die Besetzung der beiden Operatoren erfolgt gleichzeitig. Dies kann bedeuten, daß entweder die Bindung des Tet-Repressors an die Operatoren kooperativ ist, oder daß der Repressor für die beiden DNA-Regionen die gleiche Bindekonstante besitzt. Weiterhin ist bei einem 4-fach molaren Überschuß des Tet-Repressors über die DNA der Schutz vollständig (siehe Abb. 4.15 und 4.16). In den vor DNaseI Verdauung geschützten Bereichen sind vier Phosphodiesterbindungen für die DNaseI zugänglich (s. Pfeile am rechten Rand der Gele). Diese vier Positionen sind mit I bis IV ge-

Abb. 4.15: DNaseI-Schutzexperiment mit In10 Operator Plusstrang und In10 Tet-Repressor

In Spur 1 und 7 sind die Reaktionsprodukte der limitierten DNaseI Reaktion ohne Tet-Repressor aufgetragen. In Spur 2-6 sind steigende Mengen an Repressor zugegeben, wobei in Spur 2 ein 0,1 fach, in Spur 3 ein 0,3 fach, in Spur 4 ein 1,5 fach, in Spur 5 ein 5 fach und in Spur 6 ein 15 fach molarer Überschuß über die DNA eingestellt wurde. In Spur 8 ist als Größenstandard eine Maxam-Gilbert G+A Reaktion des entsprechenden DNA-Fragments aufgetragen.

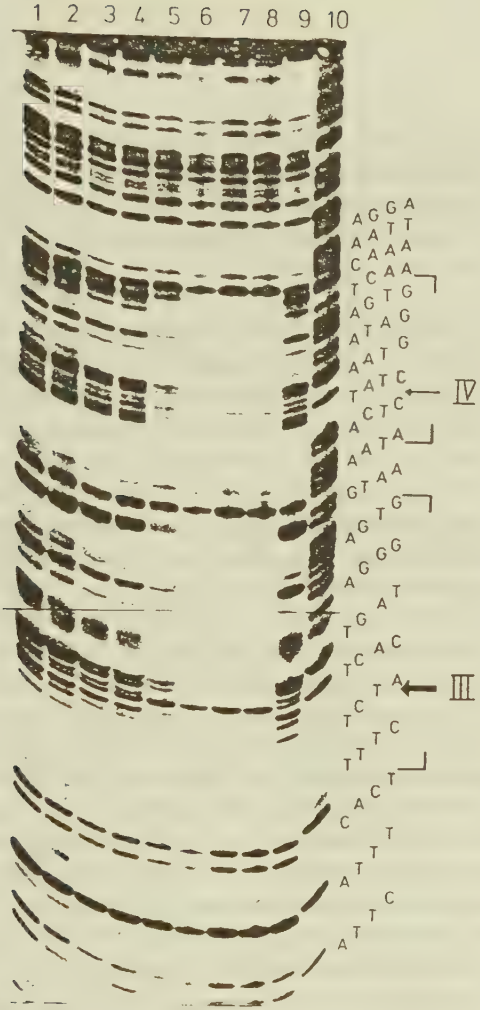


Abb. 4.16: DNaseI-Schutzexperiment mit Tn10 tet-Operator Minusstrang und Tn10 Tet-Repressor

In Spur 1 und 9 sind die Reaktionsprodukte der limitierten DNaseI Reaktion in Abwesenheit des Tet-Repressors aufgetragen. In Spur 2-8 sind steigende Mengen an Tet-Repressor zugegeben, wobei sich die Repressorkonzentrationen immer verdoppeln. Dabei ist Spur 5 ein 6 fach molarer Überschuß über die DNA erreicht. In Spur 10 ist als Größenstandard eine Maxam-Gilbert G+A Reaktion des entsprechenden DNA-Fragments aufgetragen.

kennzeichnet. Die Zugänglichkeit der DNaseI zu diesen vier Phosphodiesterbindungen ist unterschiedlich, gekennzeichnet durch die unterschiedliche Intensität der Banden auf den Autoradiogrammen. Am deutlichsten tritt dabei die Bande an Position III hervor, während bei den übrigen drei Banden keine Intensitätsunterschiede feststellbar sind.

Überträgt man jetzt diese Ergebnisse auf die DNA-Sequenz der Tn10 Tet-Kontrollregion (s. Abb. 4.17 unten) so sieht man, daß es die beiden palindromischen DNA-Sequenzen sind, an die der Tet-Repressor bindet. Weiterhin sind die durch Klammern gekennzeichneten geschützten Bereiche auf dem Plusstrang um 2-3 Nukleotide gegenüber den geschützten Bereichen auf dem Minusstrang verschoben. Die vier sensitiven Phosphodiesterbindungen im Protein-DNA-Komplex sind durch Pfeile gekennzeichnet. Sie liegen jeweils 4 Basenpaare rechts bzw. links vom palindromischen Zentrum von O_1 und O_2. Der sehr intensive Schnitt III ist in Abbildung 4.17 mit einem dicken Pfeil gekennzeichnet. Diese unterschiedliche Intensität der vier sensitiven Stellen zeigt, daß die beiden benachbarten Repressor-Operator Komplexe von der DNaseI unterschiedlich erkannt werden. Da das Protein für beide Komplexe identisch ist, muß die Ursache für diesen Unterschied auf der DNA liegen. Die beiden palindromischen Sequenzen sind jeweils 19 bp lang und ihre palindromischen Zentren sind 30 bp voneinander entfernt (s. Abb. 4.17). O_1 ist dabei ein perfektes Palindrom mit einem A/T Basenpaar im palindromischen Zentrum. Die Symmetrie der DNA-Sequenz von O_2 ist an Position sieben gerechnet vom palindromischen Zentrum aus unterbrochen und das zentrale Basenpaar selbst ist ein G/C. Somit unterscheiden sich die beiden Palindrome an zwei Positionen, einmal durch das unterschiedliche zentrale Basenpaar, und zum zweiten durch einen Basenpaaraustausch an Position sieben des Palindroms O_2 (s. Abb. 4.17).

Um nun die Bindung des Tet-Repressors an diese beiden Palindrome weiter zu untersuchen, wurden DNaseI Schutzexperimente an den isolierten Tn10 Tet-Repressor - tet-Operator O_1 und Tet-Repressor - tet-Operator O_2 Komplexen durchgeführt (s. Kap. 4.3.2 und 4.3.3).

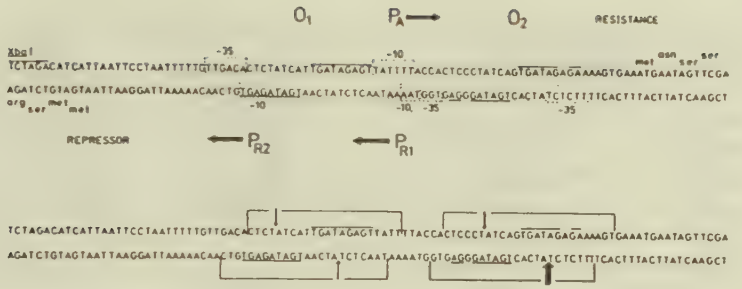


Abb. 4.17: Ergebnisse der DNaseI-Schutzexperimente von Tn10 tet-Operator mit dem Tn10 Tet-Repressor
Der obere Teil der Abbildung entspreicht Abb. 4.14.

4.3.2 DNaseI-Footprint des Operators O_1 mit dem Tn10 Tet-Repressor

Für die Schutzexperimente von O_1 mit dem Tn10 Tet-Repressor wurde die Operatorsequenz von O_1 auf dem Plasmid pWH151 benutzt (M. Geisendörfer, Diplomarbeit Darmstadt; Wray und Reznikoff, 1983). Für den Plusstrang wurde das Experiment mit dem XbaI-HindIII Fragment von pWH151 durchgeführt, wobei das 5' Ende der XbaI Stelle radioaktiv markiert war. Für den Minusstrang wurde das Experiment mit einem HindIII-HhaI Fragment durchgeführt, wobei hier das 5' Ende der HindIII Stelle radioaktiv markiert war.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.18 dargestellt. Auf der linken Seite der Abbildung befindet sich das Ergebnis für den Plusstrang und auf der rechten Seite das Ergebnis für den Minusstrang. Neben der Gelabbildung sind die DNA-Sequenzen aufgeführt, die aus den Maxam-Gilbert G+A Reaktionen, in Spur 7 abgeleitet wurden.

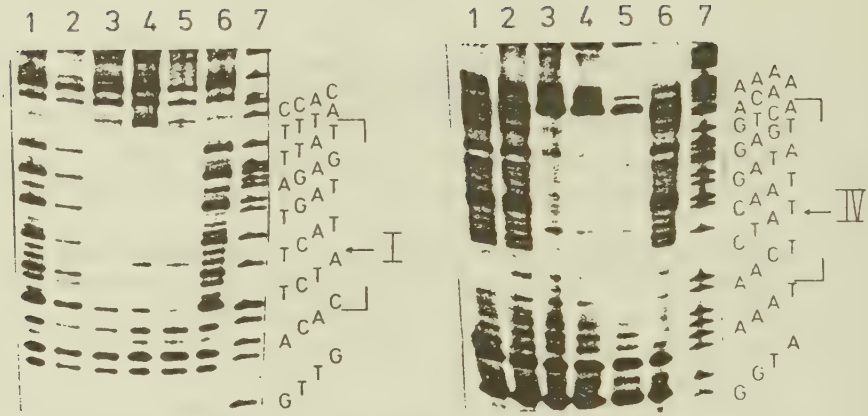


Abb. 4.18: DNaseI-Schutzexperiment von Tn10 tet-Operator O_1 mit dem Tn10 Tet-Repressor

Im linken Teil der Abbildung ist das Experiment für den Plusstrang, im rechten Teil für den Minusstrang dargestellt. In Spur 1 und 6 sind die Reaktionsprodukte der limitierten DNaseI Reaktion ohne Tet-Repressor aufgetragen. In Spur 2 bis 5 wurden steigende Mengen an Repressor zugegeben, wobei in Spur 4 ein 5fach-, in Spur 5 ein 10fach- und in Spur 6 ein 50fach molarer Überschuß über die DNA eingestellt worden war. In Spur 7 ist die Maxam-Gilbert G+A Reaktion des entsprechenden DNA-Fragments als Längenstandard aufgetragen.

Das Experiment zeigt, daß beide Stränge des Operators O_1 in Anwesenheit des Repressors vor dem Angriff der DNaseI geschützt sind. Die geschützten Phosphodiesterbindungen entsprechen dem geschützten Bereich von O_1 auf der Wildtyp DNA-Sequenz (s. Kap. 4.3.1). Die beiden sensitiven Stellen in diesem perfekten Palindrom werden von der DNaseI gleich stark geschnitten. Das heißt, daß der palindromische Operator O_1 von dem Repressor symmetrisch erkannt wird. Diese Ergebnisse der DNaseI-Schutzexperimente mit dem einzelnen Operator O_1 sind in Abbildung 4.20 zusammengefaßt und im Vergleich mit den Daten der Wildtypanordnung des tet-Operators dargestellt.

4.3.3 DNaseI-Footprint des Operators O_2 mit dem Tn10 Tet-Repressor

Für die Schutzexperimente von O_2 mit dem Tn10 Tet-Repressor wurde die Operatorsequenz von O_2 auf dem Plasmid pWH233 benutzt (C. Gatz, Diplomarbeit/Darmstadt, 1982; Hillen et al., 1983). Für den Plusstrang wurde das Experiment mit dem DdeI-Sau3a Fragment von pWH233 durchgeführt, wobei das 5' Ende der DdeI Stelle radioaktiv markiert war. Für den Minusstrang wurde das Experiment mit dem EcoRI-DdeI Fragment durchgeführt, wobei hier das 5' Ende der EcoRI Stelle radioaktiv markiert war.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.19 dargestellt. Auf der linken Seite der Abbildung ist das Ergebnis für den Plusstrang und auf der rechten Seite das Ergebnis für den Minusstrang gezeigt. Die aus dem Längenstandard in Spur 5 abgeleitete DNA-Sequenz ist jeweils rechts neben der Abbildung vermerkt.

Auch hier sind beide Stränge des isolierten Operators O_2 in Anwesenheit des Tet-Repressors vor Angriff der DNaseI geschützt. Die geschützten Bereiche auf beiden Strängen entsprechen in der Ausdehnung denen der Wildtyp DNA (s. Kap. 4.3.1). Die Phosphodiesterbindung an Position III ist für die DNaseI sehr gut zugänglich, während die DNA an Position II im Tet-Repressor - tet-Operator O_2 Komplex fast nicht mehr gespalten wird. Das heißt, daß die nicht perfekte palindromische Sequenz von O_2 von dem Repressor asymmetrisch erkannt wird.

Die Ergebnisse der Schutzexperimente mit dem einzelnen Operator O_2 sind in Abbildung 4.20 zusammengefaßt und im Vergleich mit den Resultaten des Wildtyp tet-Operators dargestellt.

Die Ergebnisse mit den einzelnen Operatoren O_1 und O_2 zeigen, daß beide Palindrome, auch wenn sie getrennt voneinander vorliegen, von dem Tet-Repressor bei Konzentrationen von 10^{-9} M besetzt werden. Die sensitiven Phosphodiesterbindungen zwischen Nukleotid vier und fünf, gerechnet vom palindromischen Zentrum, werden in O_1 gleich gut und in O_2 unterschiedlich gut erkannt.

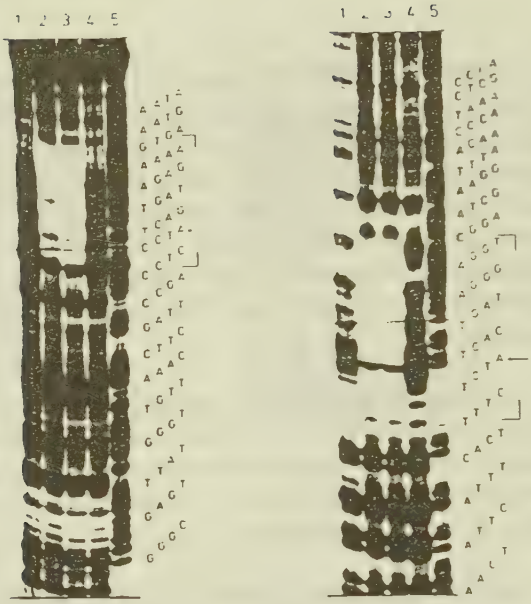


Abb. 4.19: DNaseI-Schutzexperiment von In10 tet-Operator O_2 mit dem In10 Tet-Repressor
Im linken Teil der Abbildung ist das Experiment für den Plusstrang, im rechten Teil für den Minusstrang dargestellt. In Spur 1 und 4 sind die Reaktionsprodukte der limitierten DNAseI Reaktion ohne Tet-Repressor aufgetragen. In Spur 2 ist ein 5fach- und in Spur 3 ein 10fach molarer Überschuß an In10 Tet-Repressor zugegeben worden. In Spur 5 ist die Maxam-Gilbert G+A Reaktion des entsprechenden DNA-Fragments als Längenstandard aufgetragen.

Das bedeutet, die beiden Komplexe Tet-Repressor-O_1 und Tet-Repressor-O_2 besitzen verschiedene Tertiärstrukturen. Ursache dafür kann nur ein Unterschied in den beiden Palindromen sein, und zwar entweder das unterschiedliche zentrale Basenpaar, oder der Austausch des siebten bp in O_2, wodurch dieser Operator nicht mehr perfekt palindromisch ist. Betrachtet man sich das zentrale Basenpaar, so wird das Guanin von O_2 in Anwesenheit des Tet-Repressors an seiner N_7-Position

mit Dimethylsulfat nicht methyliert, obwohl die Guanine, zwei Nukleotide entfernt, vor Methylierung geschützt sind (Hillen et al., 1984). Weiterhin findet man bei dem Vergleich der Tn10 Operatorsequenz zu den Sequenzen anderer Operatoren von Tetrazyklinresistenzoperons, daß die Nukleotide an Position zwei bis fünf, gerechnet vom palindromischen Zentrum, streng homolog sind, während das zentrale Basenpaar variabel zu sein scheint (Bertrand et al., 1983; Waters et al., 1983; Sutcliffe, J.G., 1978; Unger et al., 1984b; Klock et al., 1985). Dies zeigt, daß das zentrale Basenpaar wahrscheinlich keinen Einfluß auf die Repressorbindung hat. Daraus kann man folgern, daß der Basenpaaraustausch an Position sieben von O_2 (A/T nach G/C) für die veränderte Bindung des Tn10 Tet-Repressors auf O_2 verantwortlich ist.

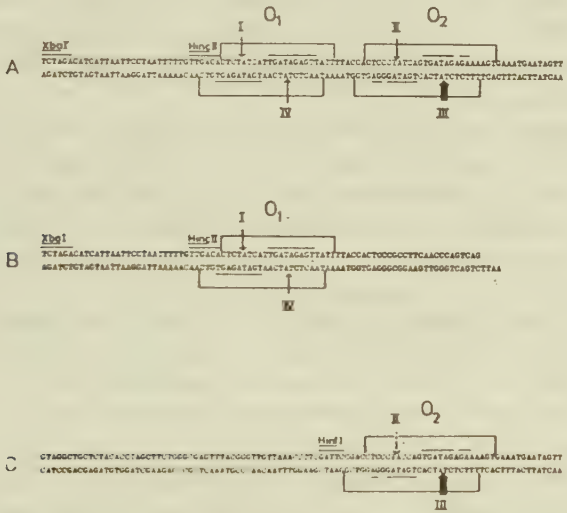


Abb. 4.20: Vergleich der DNaseI-Schutzexperimente mit dem Tn10 Tet-Repressor und der tet-Operator DNA von Tn10 (oben), sowie den isolierten Operatoren O_1 (mitte) und O_2 (unten)

Ein Vergleich der Ergebnisse der Schutzexperimente von den einzelnen Operatoren und dem Wildtyp tet-Operator zeigt, daß die Ausdehnung der geschützten Bereiche identisch ist. Die Zugänglichkeit der DNaseI zu der Phosphodiesterbindung an Position II ist aber unterschiedlich gut. Während bei den Experimenten mit dem Wildtyp Repressor-Operator Komplex hier immer eine Bande zu sehen ist, verschwindet sie bei dem isolierten Repressor Operator O_2 Komplex fast vollkommen. Dies kann nur so interpretiert werden, daß die Nachbarschaft von O_1 einen Einfluß auf den Repressor-Operator O_2 Komplex hat.

4.3.4 DNaseI-Footprint des RA1 Operators mit dem Tn10 Tet-Repressor

Neben dem Tetrazyklinresistenzoperon auf Tn10 sind noch eine Anzahl weiterer Tetrazyklinresistenzdeterminanten bekannt (Marshall et al., 1983). Sie besitzen, soweit aufgeklärt, dieselbe genetische Organisation wie das Tetrazyklinresistenzoperon auf Tn10 und die beiden Gene werden auch coreguliert (Unger et al., 1984a; Unger et al., 1984b; Waters et al., 1983; Hillen und Schollmeier, 1983; Bertrand et al., 1983; Klock et al., 1985). Die Aminosäuresequenzen der bisher bekannten Tet-Repressoren sind bis zu 70% homolog und ihre Operatoren sind analog zu dem Tn10 tet-Operator palindromische DNA-Sequenzen in Tandemanordnung (Unger, B., Doktorarbeit Darmstadt, 1984). Dadurch stellen diese Tetrazyklinresistenzoperons ein Reservoir an natürlichen Operatorsequenzmutanten dar. Eine solche Operatormutante kommt von dem Tetrazyklinresistenzoperon auf RA1 (Unger et al., 1984b). Der Sequenzvergleich der beiden Operatoren von RA1 (s. Abb. 4.21 B) und Tn10 (Abb. 4.21 A) zeigt, daß die beiden palindromischen Sequenzen von RA1 dem O_2 von Tn10 entsprechen, aber in umgekehrter Orientierung angeordnet sind. Der Abstand der palindromischen Zentren ist dabei um zwei bp kürzer als bei Tn10 und das zentrale Basenpaar ist ein A/T gegenüber einem G/C bei O_2 von Tn10. Durch die Untersuchung der heterologen Wechselwirkung von Tn10 Tet-Repressor und RA1 Operator mit DNaseI Schutzexperimenten soll jetzt die Frage beantwortet werden, ob der Tn10 Tet-Repressor auch hier die beiden Operatorsequenzen besetzt

und welchen Einfluß die Nachbarschaft von zwei Operatoren der Art von O_2 des Tn10 auf die Repressorbindung besitzt.

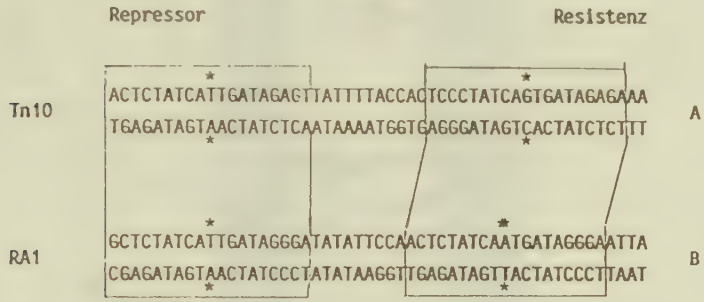


Abb. 4.21: Vergleich der Operatorsequenzen von Tn10 und RA1

Für die DNaseI Schutzexperimente des RA1 Operators mit dem Tn10 Tet-Repressor wurden zwei Fragmente des Plasmids pWHB03 benutzt (Unger et al., 1984b). Dieses Plasmid beinhaltet das 260 bp lange Sau3a Fragment von RA1 mit den beiden RA1 Operatorsequenzen (Unger et al., 1984b). Für die DNaseI Schutzexperimente des Plusstrangs wurde das HinfI-XbaI Fragment mit der radioaktiven Markierung an dem 5' Ende der HinfI Stelle eingesetzt. Für den Minusstrang wurde ein XbaI-EcoRI Fragment benutzt, wobei hier das 5' Ende der XbaI Stelle radioaktiv markiert war.

Die Ergebnisse für den Plusstrang sind in Abb. 4.22 und für den Minusstrang in 4.23 dargestellt. Die Ergebnisse in Abb. 4.22 und 4.23, zusammen mit ihrer Interpretation in Abb. 4.24 zeigen, daß die beiden palindromischen DNA-Sequenzen der RA1 tet-Kontrollregion von dem Tn10 Tet-Repressor als Operatoren erkannt werden. Die Besetzung der beiden Bereiche erfolgt gleichzeitig, und ist bei einem vierfach molaren Überschuß des Repressorproteins über die DNA vollständig. Zwischen den palindromischen Sequenzen sind vier bis fünf Phosphodiesterbindungen

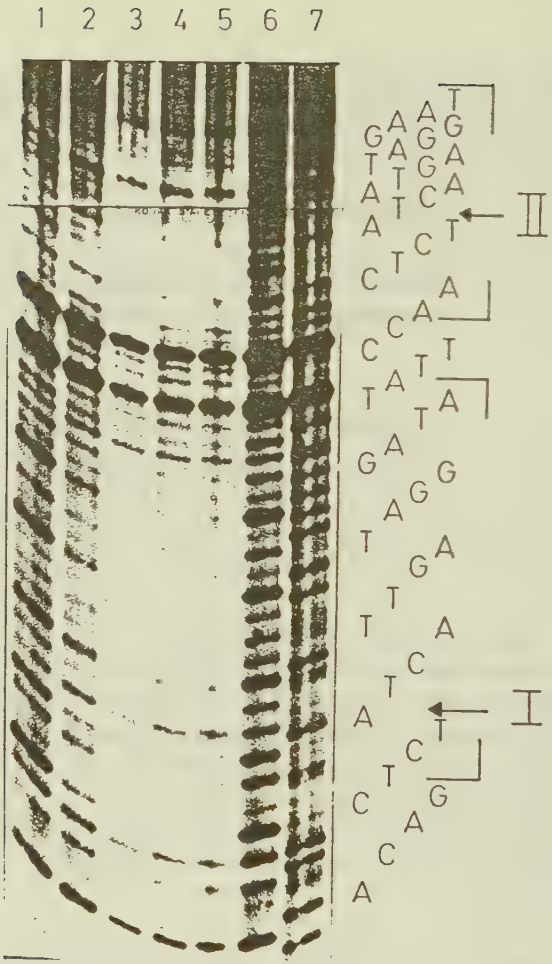


Abb. 4.22: DNaseI-Schutzexperiment mit RA1 Operator Plusstrang und In10 Tet-Repressor

In Spur 1 und 6 sind die Reaktionsprodukte der limitierten DNaseI Reaktion ohne Tet-Repressor aufgetragen. In Spur 2-5 sind steigende Mengen an Tet-Repressor zugegeben, wobei in Spur 2 ein 2fach-, in Spur 3 ein 5fach-, in Spur 4 ein 10fach- und in Spur 5 ein 20fach molarer Überschuß über die DNA eingestellt wurde. In Spur 7 ist als Größenstandard eine Maxam-Gilbert G+A Reaktion des entsprechenden DNA-fragments aufgetragen.

Abb. 4.23: DNaseI-Schutzexperiment mit RA1 Operator Minusstrang und Tn10 tet-Repressor

In Spur 1 und 6 sind die Reaktionsprodukte der limitierten DNaseI Reaktion in Abwesenheit des Tet-Repressors aufgetragen. In Spur 2-5 sind steigende Mengn an Tet-Repressor zugegeben, wobei in Spur 2 ein molares Verhältnis vob 1:1, in Spur 3 ein 5fach-, in Spur 4 ein 10fach- und in Spur 5 ein 50fach molarer Überschuß Über die DNA eingestellt wurde. In Spur 7 ist als Größenstandard eine Maxam-Gilbert G+A Reaktion des entsprechenden DNA-Fragments aufgetragen.

für die DNaseI zugänglich. Auch in dem geschützten Bereich sind vier Phosphodiesterbindungen für die DNaseI zugänglich, und zwar jeweils die Phosphodiesterbindungen zwischen Nukleotid vier und fünf rechts und links vom palindromischen Zentrum (siehe Abb. 4.24). Vergleicht man die Intensität der dazugehörigen Banden auf dem Autoradiogramm, so findet man keinen Unterschied in ihrer Intensität.

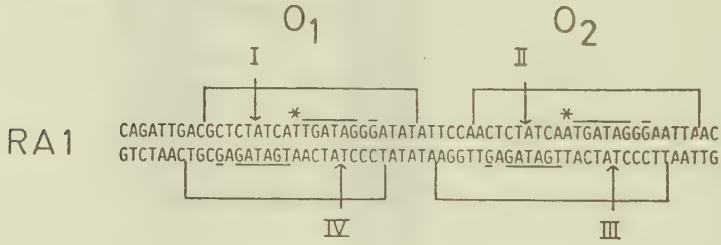


Abb. 4.24: Ergebnisse der Schutzexperimente von RA1 Operator und Tn10 Tet-Repressor

Die DNaseI Schutzexperimente des Tn10 Repressors mit seinen eigenen Operatoren und den Operatoren von RA1 sind damit sehr ähnlich (vergleiche Abb. 4.17 und 4.24). Der einzige auffallende Unterschied besteht in der Zugänglichkeit der vier Phosphodiesterbindungen in den geschützten Bereichen. Während alle vier Stellen im RA1 Operator gleich gut von der DNaseI erkannt werden, ist die Position III (siehe Abb. 4.17) des Operators O_2 von Tn10 hypersensitiv. Da aber die Operatorregion von RA1 einer Tandemanordnung des Operators O_2 von Tn10 entspricht, hätte man hier die Intensitätsunterschiede des Tn10 Operators O_2 bei beiden RA1 Operatoren als Ergebnis der DNaseI Schutzexperimente erwartet. Stattdessen wird der Asymmetrieeffekt des Operators O_2 von Tn10 bei einer Tandemanordnung gerade aufgehoben. Dies bedeutet, daß sich bei der RA1 Operator-DNA die beiden Repressor-Operator-Komplexe gegenseitig beeinflussen. Erklärbar ist dies nur durch einen Protein - Protein-Kontakt der beiden Repressordimere. Rückschlüsse auf solch einen Protein - Protein-Kontakt bei dem Tn10 Tet-Repressor - tet-Ope-

rator Komplex sind aber nur bedingt möglich, da bei RA1 die beiden Operatoren einen um zwei Basenpaare kürzeren Abstand besitzen als die Operatoren bei Tn10 und damit andere sterische Verhältnisse vorliegen.

4.4 Veränderung des Abstandes der Tn10 tet-Operatoren O_1 und O_2

Die Bindekonstante des Tn10 Tet-Repressors zu den Tn10 Operatoren liegt zwischen 10^{12} und 10^{13} M^{-1} (Hillen et al., 1983). Der genaue Wert für die Bindekonstante kann in diesem Größenordnungsbereich nicht mehr gemessen werden. Daher sollte jetzt der relative Unterschied der Bindekonstante von O_1 und O_2 durch eine kompetitive Besetzung mit dem Tet-Repressor bestimmt werden.
Weiterhin sollte die Mobilität von Tn10 Tet-Repressor - tet-Operator Komplexen auf 5% Polyacrylamidgelen untersucht werden, wobei der Abstand der beiden Operatoren O_1 und O_2 gegenüber dem Wildtyp (30 bp; siehe Kap. 4.3) vergrößert ist. Durch diese Vergrößerung des Abstandes können Protein - Protein Kontakte der Tet-Repressordimere im Protein-DNA Komplex nur durch Biegung der DNA hergestellt werden. Diese Biegung würde die Persistenzlänge der DNA-Fragmente verändern und sollte dadurch das Laufverhalten auf Polyacrylamidgelen beeinflussen. Eine ähnliche Strukturänderung der DNA ist für den Gal-Repressor - gal-Operator Komplex postuliert (Majumdar und Adhya, 1984). Für solche Untersuchungen mußte ein Plasmid konstruiert werden, bei dem die beiden Operatoren 100 bp oder mehr voneinander entfernt sind und dazwischen eine einzelne Restriktionsendonukleaseerkennungsstelle liegt. Über diese Restriktionsstelle konnten dann durch Deletion und Religation neue kleinere Abstände erzeugt, aber auch die beiden palindromischen Sequenzen voneinander getrennt werden.

4.4.1 Konstruktion der Plasmide pWH971 und pWH972

Zur Klonierung eines Plasmids, das die beiden Tn10 Operatoren O_1 und O_2 in einem großen Abstand trägt, mußten O_1 und O_2 auf getrennten Fragmenten isoliert werden. Dazu wurden Deletionsmutanten benutzt, die

nur noch jeweils einen der beiden Operatoren besitzen (Hillen et al., 1983; Wray und Reznikoff, 1983). Zuerst wurde das Plasmid pWH151 (Geißendörfer, Diplomarbeit Darmstadt) mit XbaI-AluI verdaut und das 99 bp lange XbaI-AluI Fragment nach einer 5% Polyacrylamidgelelektrophorese vom Gel eluiert. Dieses Fragment trägt den Operator O_1 und ist in Abb. 4.25, Spur 2, mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das 100 bp lange AluI Fragment, das bei der Verdauung von pWH151 ebenfalls entsteht und die Bande des 99 bp langen XbaI-AluI Fragments überlagert, wurde nicht abgetrennt, da es mit seinen beiden AluI Enden die Konstruktion der neuen Mutante nicht nachteilig beeinflussen sollte (siehe Strategie in Abb. 4.25). Der Operator O_2 wurde auf einem 130 bp langen AluI-EcoRI Fragment nach der Verdauung von pWH233 (Hillen et al., 1983) mit diesen Restriktionsnukleasen von einem 5% Polyacrylamidgel isoliert. Die entsprechende Bande ist in Abb. 4.25, Spur 4 mit einem Pfeil gekennzeichnet.

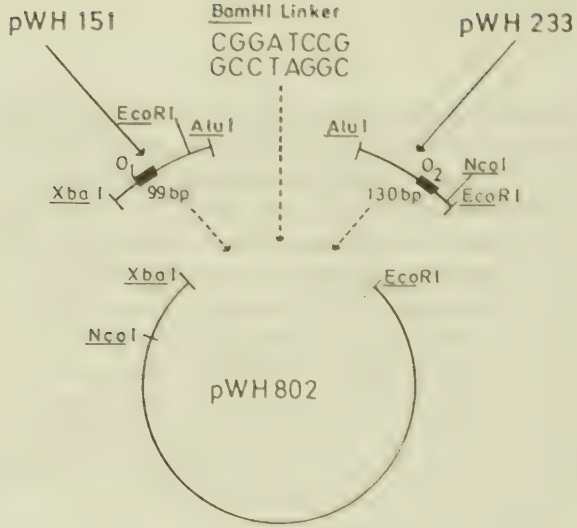
Als Vektor wurde das Plasmid pWH802 mit XbaI-EcoRI restringiert und mit der alkalischen Kälberdarmphosphatase dephosphoryliert (s. Kap. 3.2). Das neben dem Vektor entstehende 21 bp lange XbaI-EcoRI Fragment wurde nicht abgetrennt, da es aufgrund der Dephosphorylierung nicht mit dem Vektor religierbar sein sollte.

Für die Einführung einer einzelnen Schnittstelle zwischen den beiden Operatoren wurde ein BamHI-Linker von P.L. Biochemicals benutzt. 150 pMol dieses zu sich selbst komplementären Oligonukleotids mit der Sequenz $^{5'}$CGGATCCG$^{3'}$ wurde in einem Volumen von 10 µl an seinen 5' Enden phosphoryliert und dann direkt in die Ligation eingesetzt. Die Ligation selbst wurde in einem Volumen von 60 µl, mit 0,01 pMol Vektor und mit 0,2 pMol von jedem der beiden Operatorfragmente durchgeführt. Zuerst erfolgte dabei eine Inkubation für 2 Stunden bei 4°C mit 1 U T4-DNA Ligase um die Verknüpfung der überstehenden Enden zu bevorzugen, und dann wurden die glatten Enden durch Zugabe von 10 U T4-DNA Ligase und einer Inkubation von 14 Stunden bei 20°C ligiert (Klock, G. 1982).

Kompetente E.coli RR1 wurden anschließend mit dem Ligaseansatz transformiert und nach einer Selektion auf Colicinresistenz (s. Kap. 3.15.2) auf LB-Agarplatten plus 0,5% Doc ausgestrichen. Die Transformationsrate für die Rekombinanten betrug ca. $8 \cdot 10^4$ Kolonien/µg eingesetzte DNA. Von 30 gefundenen Klonen wurden Schnellanalysen durchgeführt (s. Kap. 3.16) wobei fünf davon auf einem Agarosegel ein verzögertes Laufverhalten im Vergleich zu dem eingesetzten Vektor zeigten. Die Plasmide dieser fünf Kandidaten wurden in je 1 Liter M9-Minimalmedium präpariert (Kap. 3.18) und weiter analysiert. Zwei dieser Kandidaten waren mit XbaI und BamHI linearisierbar (s. Abb. 4.25, Spur 6,8,10 und 12) und mit der Restriktionsnuklease EcoRI wurde ein kleines DNA-Fragment aus dem rekombinanten Plasmid herausgeschnitten (s. Abb. 4.25, Spur 7 und 11).

Mit diesen Restriktionen konnte gezeigt werden, daß sowohl das Operator O_1 Fragment (XbaI-Linearisierung) als auch der Linker (BamHI-Linearisierung) und aufgrund der zwei EcoRI Schnittstellen beide Operatorfragmente zusammen insertiert sein mußten (s. Konstruktion in Abb. 4.25).

Die drei weiteren Kandidaten enthielten nur eines der beiden Operatorfragmente und wurden nicht weiter untersucht. Um die beiden gefundenen Klone weiter zu analysieren wurde eine XbaI-NcoI Verdauung durchgeführt. Diese Restriktion sollte neben einem großen NcoI Vektorfragment von 3425 bp und einem kleinen XbaI-NcoI Vektorfragment von 296 bp das neue Operatorfragment mit einer Länge von 226 bp liefern (s. Abb. 4.25, Spur 13 und 14). Aus den Gelspuren 13 und 14 in Abb. 4.25 wurden aber unterschiedliche Längen für das XbaI-NcoI Operatorfragment der beiden Kandidaten ermittelt, und zwar ca. 230 bp in Spur 13 und 240 bp in Spur 14. Daher wurde vermutet, daß der in Spur 13 der Abb. 4.25 analysierte Klon einen BamHI-Linker besitzt und der Klon in Spur 14 zwei BamHI-Linker.



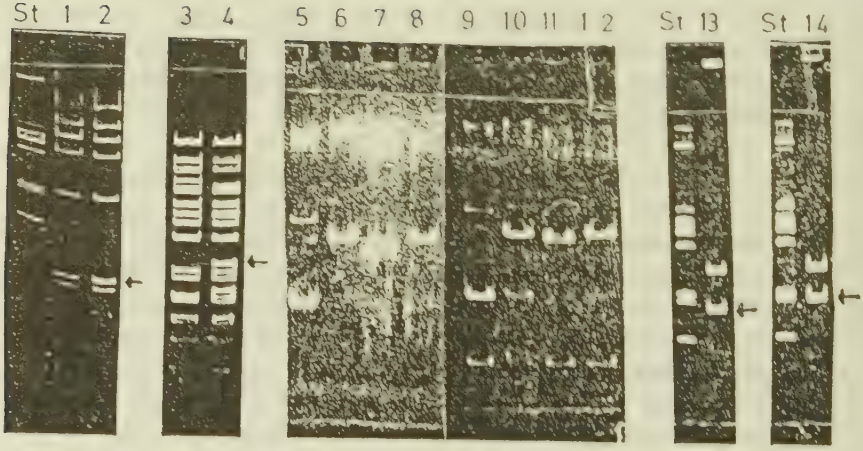


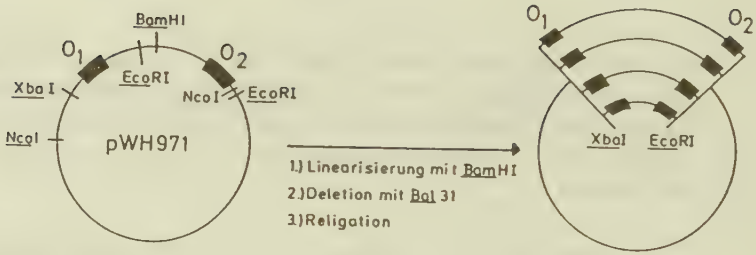
Abb. 4.25: Konstruktion der Abstandsmutanten pWH971 und pWH972
In den Gelspuren 1 bis 14 sind aufgetragen: Spur 1: pWH151 AluI; 2: pWH151 XbaI/AluI; 3: pWH233 AluI; 4: pWH233 EcoRI/AluI; 5: pWH971; 6: pWH971 XbaI; 7: pWH971 EcoRI; 8: pWH971 BamHI; 9: pWH972; 10: pWH972 XbaI; 11: pWH972 EcoRI; 12: pWH972 BamHI; 13: pWH971 XbaI/NcoI; 14: pWH972 XbaI/NcoI. In den mit St gekennzeichneten Spuren ist als Größenstandard pWH51 EcoRI/HaeIII aufgetragen.

Diese beiden rekombinanten Plasmide werden im folgenden mit pWH971 (ein BamHI Linker) und pWH972 (zwei BamHI Linker) bezeichnet. Dabei sollten die beiden Operatoren bei pWH971 einen berechneten Abstand zwischen den palindromischen Zentren von 120 bp und bei pWH972 von 128 bp besitzen.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse mußte jetzt die DNA-Sequenz der beiden Klone ermittelt werden (s. Kap. 4.4.3). Dann konnten, ausgehend von der BamHI Stelle, neue kürzere Abstandsmutanten hergestellt (Kap. 4.4.2) und die Bindung des Tn10 Tet-Repressors an diese Mutanten untersucht werden (Kap. 4.4.4 und 4.4.5).

4.4.2 Konstruktion der Plasmide pWH973, pWH974 und pWH975

Um neue kleinere Abstände zwischen den beiden Operatoren zu konstruieren, wurde, ausgehend von der einzelnen BamHI Stelle auf pWH971, eine Bal31 Verdauung durchgeführt (s. Abb. 4.26). Das Plasmid pWH971 wurde dafür mit BamHI linearisiert und zum Austesten der Bal31 Konzentration mit steigenden Mengen Bal31 inkubiert. Die Menge der eingesetzten DNA betrug jeweils 0,5 µg. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 µl für 20 Minuten bei 30°C durchgeführt (s. Abb. 4.26, Spur drei bis sechs). Dabei wurden in Spur drei, $5 \cdot 10^{-3}$ Units; in Spur vier, 10^{-2} Units; in Spur fünf, $2 \cdot 10^{-2}$ Units und in Spur sechs, $4 \cdot 10^{-2}$ Units Bal31 eingesetzt. In Spur eins ist das linearisierte Plasmid pVH51 aufgetragen, das eine Länge von 3847 bp besitzt (Hershfield et al., 1976). In Spur zwei ist das BamHI linearisierte Plasmid pWH971 aufgetragen, das 3946 bp lang ist. Bei einer maximal erwünschten Deletion, bei der beide Operatoren gerade noch erhalten bleiben, können 100 bp deletiert werden. Dadurch muß das Bal31 behandelte lineare Plasmid pWH971 eine Mindestlänge von 3846 bp haben. Das heißt, die linearen Banden von pVH51 in Spur eins und pWH971 in Spur zwei der Abbildung 4.26 stellen die untere und obere Grenze dar, in dem die neuen Abstandsmutanten gesucht werden müssen. Vergleiche der gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA von Spur drei bis sechs mit dem Standard in Spur eins und zwei ergaben, daß Bal31 Mengen zwischen 10^{-2}



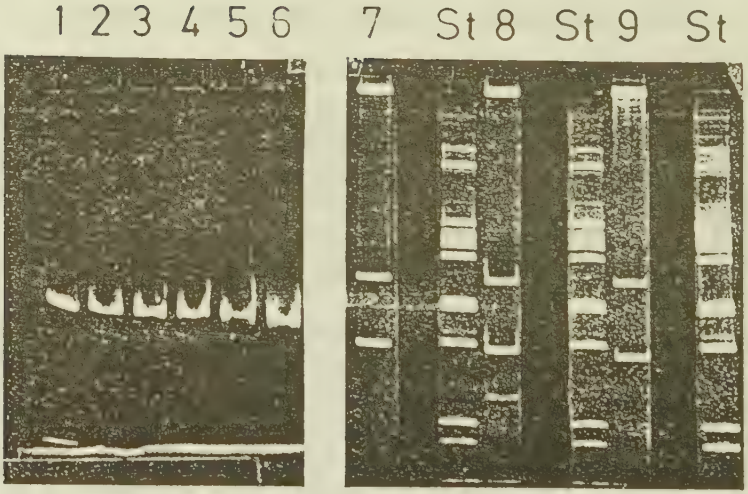


Abb. 4.26: Konstruktion der Plasmide pWH973, pWH974 und pWH975
In den Gelspuren 1-9 sind aufgetragen: Spur 1: pVH51 EcoRI; 2: pWH971 BamHI; 3-6: siehe Text; 7: pWH973 XbaI/NcoI; 8: pWH974 XbaI/NcoI; 9: pWH975 XbaI/NcoI. Auf den mit St gekennzeichneten Spuren ist als Längenstandard pVH51 EcoRI/HaeIII aufgetragen.

und 12×10^{-2} Units bzw. 2×10^{-2} und 4×10^{-1} Units für zwei Reaktionsansätze zur Deletion von 1 bis 100 bp geeignet sind.

Aus diesem Grund wurden zwei Bal31 Verdauungen mit $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ Units und $3 \cdot 10^{-2}$ Units Bal31 nach obiger Vorschrift durchgeführt, das Enzym anschließend durch eine Phenolisierung inaktiviert und die entstandenen Deletionsprodukte nach einer Etherextraktion und einer Ethanolfällung mit T4 DNA Ligase rückligiert. Der Ansatz wurde dann in E.coli RRI transformiert und nach einer Selektion auf Colicinimmunität auf LB-Agarplatten mit 0,5% Doc ausgestrichen. Die Transformationsrate der rekombinanten Plasmide betrug $1{,}6 \cdot 10^{4}$ Kolonien/µg eingesetzte DNA.

Von 42 dieser Klone wurden für eine Größenanalyse Schnellanalysen durchgeführt. Mit den Kandidaten, die auf einem Agarosegel ein Laufverhalten zwischen pVH51 und pWH971 zeigten (siehe oben) wurden Minipräparationen durchgeführt, und die Plasmid-DNA durch eine XbaI-NcoI Verdauung und anschließende 5% Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Auf diese Weise wurden drei neue Abstandsmutanten gefunden. Die Plasmide werden im folgenden mit pWH973, pWH974 und pWH975 bezeichnet. Ihre XbaI-NcoI Verdauung ist in Abb. 4.26, Spur sieben, acht und neun gezeigt.

Aus den Längenberechnungen der XbaI-NcoI Fragmente ergeben sich für die beiden Operatoren Abstände zwischen den beiden palindromischen Zentren von 70 bp bei pWH973, 65 bp bei pWH974 und 60 bp bei pWH975. Die genauen Abstände wurden durch die Bestimmung der DNA-Sequenz zwischen den beiden Operatoren ermittelt (s. Kap. 4.4.3).

4.4.3 Sequenzierung der Plasmide pWH971 bis pWH975

Für die Sequenzierung wurden die fünf Plasmide an ihren einzelnen XbaI Stellen linearisiert (s. Abb. 4.25 und 4.26), die 5' Enden nach der Dephosphorylierung (Kap. 3.2) radioaktiv markiert (Kap. 3.4.1) und dann mit der Endonuklease NcoI restringiert. Nach der Auftrennung der

Fragmente auf einem 5% Polyacrylamidgel wurden die XbaI-NcoI Operatorfragmente vom Gel eluiert und für die Maxam-Gilbert DNA-Sequenzierung eingesetzt (s. Kap. 3.5). Dabei wurden für die Plasmide pWH971 und pWH972 die vier Reaktionen G > A; G+T, T+C, T < C, durchgeführt. Die Autoradiogramme der Gele sind in Abbildung 4.27 dargestellt. Mit den Operatorfragmenten von pWH973, pWH974 und pWH975 wurde nur eine G+A Reaktion durchgeführt. Das Autoradiogramm dieser Gele ist in Abb. 4.28 dargestellt. Die ermittelten DNA-Sequenzen sind in Abb. 4.29 aufgelistet.

Die Sequenz der Operatorregion von pWH971 und pWH972 ergab, daß beide Plasmide die Operatoren O_1 und O_2 besitzen, und daß ihre Abstände unterschiedlich sind (s. Abb. 4.29). Der Unterschied kommt durch die Insertion eines BamHI Linkers bei pWH971, während pWH972 zwei BamHI Linker zwischen den beiden Operatorfragmenten besitzt. An den Ligationsstellen der Linker traten dabei unerwartete Deletionen auf. So fehlte bei den beiden insertierten BamHI Linkern in pWH972 jeweils das eine endständige G/C Basenpaar, welches nicht mehr zu der sechs Nukleotide langen Erkennungssequenz gehört. Bei pWH971 ist ebenfalls eines der beiden endständigen G/C Basenpaare zusammen mit dem dazu in Nachbarschaft befindlichen letzten Basenpaar (C/G) des AluI-EcoRI Fragments, welches den Operator O_2 besitzt, deletiert (s. Abb. 4.29).

Die Sequenzierung der Plasmide pWH973, pWH974 und pWH975 zeigte, daß diese kürzeren Abstandsmutanten auch noch beide Operatoren haben (s. Abb. 4.29). Dabei genügten die durchgeführten G+A Reaktionen um die Sequenz von pWH973, pWH974 und pWH975 der Sequenz von pWH971 oder pWH972 zuzuordnen und so die neuen Abstände genau zu bestimmen.

Zusammenfassend ergeben sich aus der Sequenzierung der Plasmide pWH971 bis pWH975 für die beiden Operatoren O_1 und O_2 Abstände zwischen den Zentren der Palindrome von 126 bp bei pWH972, 118 bp bei pWH971, 63 bp bei pWH973, 59 bp bei pWH974 und 54 bp bei pWH975.

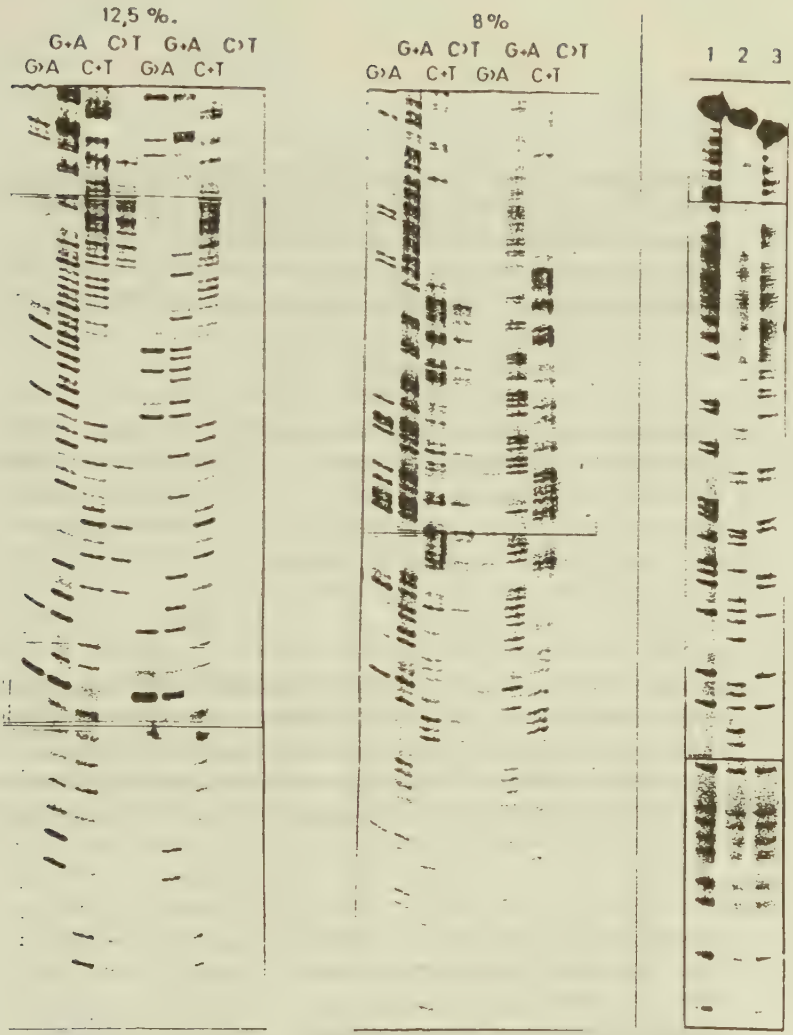


Abb. 4.27: Autoradiogramme der 18,5% und 8% Polyacrylamidgele zur Sequenzierung der Abstandsmutanten von pWH971 und pWH972
Auf den linken vier Spuren der Gele ist pWH971 und auf den rechten vier Spuren pWH972 aufgetragen.

Abb. 4.28: Autoradiogramm zur Sequenzierung der Abstandsmutanten von pWH973 bis pWH975
In den Spuren 1-3 sind die G+A Sequenzierreaktionen von pWH973 (Spur 1), pWH974 (Spur2) und pWH975 (Spur 3)

```
XbaI                          HincII          O1
TCTAGACATCATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACTCCCGCC
TCTAGACATCATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACTCCCGCC
TCTAGACATCATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACTCCCGCC
TCTAGACATCATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTA----------------
TCTAGACATCATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACTCCCGCC

                                BamHI   BamHI
TTCAACCCAGTCAGAATTCTCATGTTTGACAG-GGATCCG-GGATCCGCTTCCGGGCGAGTTTACGGGTT
TTCAACCCAGTCAGAATTCTCATGTTTGACAGCGGATCC----------TTCCGGGCGAGTTTACGGGTT
----------------------------------------------------------------GGGTT
--------------------------------------------------GGGCGAGTTTACGGGTT
------------------------------------------------------------------

                          O2
GTTAAACCTTCGATTCCGACCTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAAAGATCG
GTTAAACCTTCGATTCCGACCTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAAAGATCG
GTTAAACCTTCGATTCCGACCTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAAAGATCG
GTTAAACCTTCGATTCCGACCTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAAAGATCG
----AACCTTCGATTCCGACCTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAAAGATCG
```

NcoI EcoRI	Plasmid	Δ O_1-O_2
CATTGGTAATTACGTTACTCGATGCCATGGGGATTGGAATTC	pWH972	126
CATTGGTAATTACGTTACTCGATGCCATGGGGATTGGAATTC	pWH971	118
CATTGGTAATTACGTTACTCGATGCCATGGGGATTGGAATTC	pWH973	63
CATTGGTAATTACGTTACTCGATGCCATGGGGATTGGAATTC	pWH974	59
CATTGGTAATTACGTTACTCGATGCCATGGGGATTGGAATTC	pWH975	54

Abb. 4.29: DNA-Sequenz des Plusstranges der Operatorregion von pWH971, pWH972, pWH973 pWH974 und pWH975
Die gestrichelten Linien zeigen die deletierten DNA-Bereiche.

4.4.4 Mobilität der Tn10 Tet-Repressor - tet-Operator Komplexe auf Polyacrylamidgelen

Eine Methode Protein-DNA Komplexe zu analysieren ist die Messung ihres Laufverhaltens auf Polyacrylamidgelen im Vergleich zu der freien DNA (Garner und Revzin, 1981; Fried und Crothers, 1981). So verhält sich das 187 bp lange EcoRI Fragment von Tn10 mit den beiden Wildtyp-operatoren (siehe Kap. 4.3.1) auf einem 5% Polyacrylamidgel wie ein 410 bp langes DNA-Fragment, wenn es mit dem Tn10 Tet-Repressor komplexiert ist. Das heißt, es zeigt ein um 223 bp verzögertes Laufverhalten (Geißendörfer, Diplomarbeit Darmstadt). Auf die gleiche Weise sollte jetzt die Bindung des Tn10 Tet-Repressors an die beiden Operatoren der Abstandsmutanten untersucht werden. Dadurch sollte festgestellt werden, ob die verschiedenen Protein-DNA Komplexe eine unterschiedliche Verzögerungsstrecke besitzten. Das wäre der Fall, wenn sich die Persistenzlange der DNA im Komplex ändern würde, wie es für die Bindung von CRP an die Promotorregion des Lactose- und Galactose Operons von E.coli beschrieben ist (Kolb et al., 1983; Spassky et al., 1984). Das wiederum würde bedeuten, daß zwischen den zwei Repressordimeren Protein-Proteinkontakte vorliegen, die die Struktur der DNA beeinflussen.

Für die Verzögerungsgele wurden die Plasmide pWH971 bis pWH975 mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und NcoI restringiert. Dabei entstanden, wie schon in Kapitel 4.4.1 näher beschrieben, drei Fragmente, zwei Vektorfragmente von 3425 bp und 296 bp Länge und das XbaI-NcoI Operatorfragment, das bei pWH971 eine Länge von 224 bp, bei pWH972 - 232 bp bei pWH973 - 169 bp, bei pWH974 - 165 bp und bei pWH975 eine Länge von 160 bp besitzt (siehe Tab. 4.6) Die restringierten Plasmide wurden dann auf einem 5% Polyacrylamidgel ohne Tn10 Repressor und mit einem 5fach molaren Überschuß an Protein, wie in Kapitel 3.6.4 beschrieben, elektrophoretisiert. Das Experiment ist in Abbildung 4.30 dargestellt. In Spur eins ist das 187 bp EcoRI Fragment mit der Wildtypanordnung der beiden Operatoren von Tn10 (s. Kap. 4.3.1) und in den Spuren zwei bis sechs die restringierten Plasmide pWH971 bis pWH975 aufgetragen. In den mit einem minus gekennzeichneten Spuren ist die DNA ohne Tn10 Tet-Repressor und in den mit einem plus gekennzeichneten

Spuren mit einem 5fach molaren Überschuß an Repressor elektrophoretisiert. Das Experiment zeigt, daß alle Operatorfragmente in Anwesenheit des Tet-Repressors ein verzögertes Laufverhalten zeigen. Die scheinbaren Längen der verzögerten DNA-Banden wurden mit Hilfe des Größenstandards pVH51 HaeIII/EcoRI, der in den mit St gekennzeichneten Spuren aufgetragen wurde, ermittelt (s. Tab. 4.6). Aus der Differenz der scheinbaren Länge des verzögerten Operator-Fragments und seiner tatsächlichen Länge ergibt sich dann die Verzögerungsstrecke (siehe Tab. 4.6). Sie beträgt für das 187 bp EcoRI Fragment mit der Wildtypanordnung der beiden Operatoren 203 bp und für die Abstandsmutanten von pWH971 bis pWH975 206 bp, 204bp; 206 bp, 205 bp und 205 bp. Damit werden alle hier untersuchten Operator-Fragmente mit ihren unterschiedlichen Operatorabständen gleich stark verzögert. Das heißt, daß der Abstand der beiden Operatoren keinen Einfluß auf die Persistenzlänge des DNA-Fragments im Protein-DNA Komplex hat.

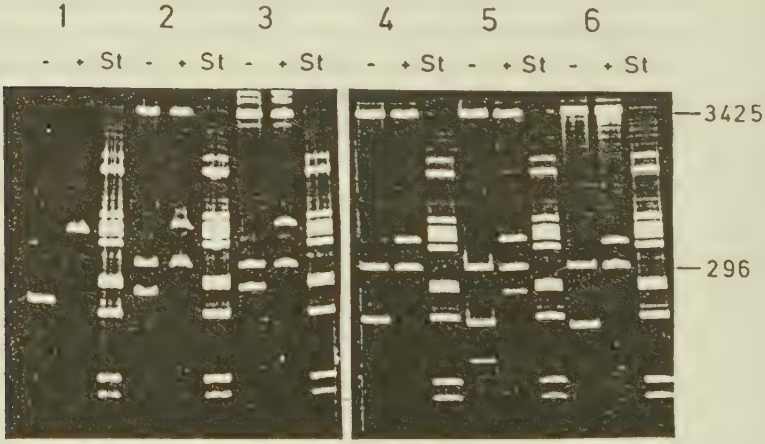


Abb. 4.30: Verzögerung der Operatorfragmente von pWH971 bis pWH975 auf einem 5% Polyacrylamidgel mit einem 5fach molaren Überschuß an Tn10 Tet-Rrpressor
In Spur 1 ist das 187 bp EcoRI Fragment von pWH101 aufgetragen (siehe Kap. 4.3.1). In den Spuren 2-6 sind die XbaI/NcoI Verdauungen der Plasmide pWH971 (2), pWH972 (3), pWH973 (4), pWH974 (5) und pWH975 (6) aufgetragen. In den mit St gekennzeichneten Spuren ist als Größenstandard pVH51 EcoRI/HaeIII aufgetragen (s. Kap. 3.2.1).

Plasmid	Δ O_1-O_2 (bp)	Fragmentlänge (bp)	scheinbare Länge der verzögerten DNA-Bande (bp)	Verzögerungsstrecke (bp)
pWH101	30	187	390	203
pWH971	118	224	430	206
pWH972	126	232	436	204
pWH973	63	169	375	206
pWH974	59	165	370	205
pWH975	54	160	365	205

Tabelle 4.6: Laufverhalten der verschiedenen Operatorfragmente mit und ohne Tn10 Tet-Repressor auf 5% Polyacrylamidgelen.
Spalte 1 gibt die jeweils benutzten Plasmide an. Spalte 2 zeigt die Abstände der beiden Operatoren gerechnet vom palindromischen Zentrum zum palindromischen Zentrum. In der dritten Spalte sind die Längen der jeweils benutzten Operatorfragmente, in Spalte 4 deren scheinbare Länge wenn sie mit dem Tet-Repressor komplexiert sind und in Spalte 5 die Differenz der beiden Bandenlängen aufgelistet.

4.4.5 Relativer Unterschied der Bindekonstanten von den Tn10 Operatoren O_1 und O_2

In Kapitel 4.3 wurde die Bindung des Tn10 Tet-Repressors an die beiden Operatoren O_1 und O_2 in der Wildtypsequenz durch DNaseI Schutzexperimente untersucht. Ein Ergebnis dabei war, daß die beiden Operatoren von dem Repressor gleichzeitig besetzt werden, was nur auf gleiche Bindekonstanten oder auf einen kooperativen Effekt zurückzuführen ist. Um diese Frage zu klären, sollte der relative Unterschied der Bindekonstante von O_1 und O_2 durch eine kompetitive Bindung des Tet-Repressors an die beiden Operatoren bestimmt werden.

Dafür wurde das Plasmid pWH971 (s. Kap. 4.4.1) mit der Restriktionsendonuklease BamHI linearisiert und, nach einer Dephosphorylierung (s. Kap. 3.2), an seinen 5'-Enden radioaktiv markiert (siehe Kap. 3.4). Das dabei nicht umgesetzte $\gamma^{32}P$ ATP wurde durch eine G 50 Säulenchromatographie mit einer 4 mm x 100 mm Säule (Pasteurpipette) abgetrennt. Als Säulenpuffer war 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 mM EDTA benutzt worden.

Anschließend wurde das lineare Plasmid mit NcoI restringiert. Dadurch erhält man ein radioaktiv markiertes 407 bp langes NcoI-BamHI

Fragment mit dem Operator O_1 und ein 121 bp langes BamHI-NcoI Fragment mit dem Operator O_2. Ist diese Verdauung vollständig, so liegen die beiden Operatorfragmente in äquimolaren Mengen vor. 0,6 pMol von jedem dieser beiden Operatorfragmente wurden dann mit steigenden Mengen Tet-Repressor in einem Volumen von 30 µl versetzt, eine Stunde bei 37°C inkubiert und auf einem 5% Polyacrylamidgel mit 1,5 V/cm elektrophoretisiert. Ein solches Ergebnis ist in Abb. 4.31 exemplarisch dargestellt. In den Spuren eins und zwölf sind dabei die beiden Operatorfragmente ohne Repressor aufgetragen. In den Spuren zwei bis elf sind steigende Mengen Tet-Repressor zugegeben worden (siehe Fußnote Abb. 4.31). Schon auf dem Autoradiogramm ist zu erkennen, daß das DNA-Fragment mit dem Operator O_2 mehr verzögert wird als das entsprechende Fragment mit O_1.

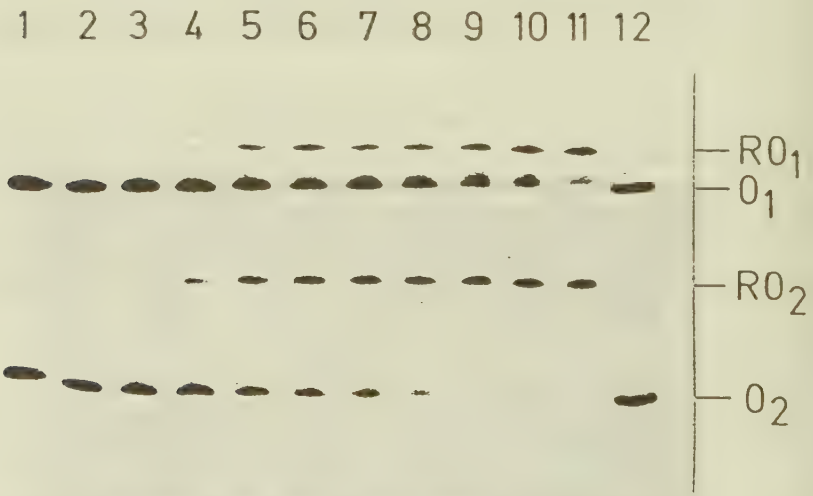


Abb. 4.31: Autoradiogramm einer kompetitiven Verzögerung der beiden Operatoren O_1 und O_2 auf einem 5% Polyacrylamidgel mit In10 Tet-Repressor
Die unverzögerten Operatorfragmente sind mit O_1 und O_2 gekennzeichnet. Die verzögerten Repressor-Operator-Komplexe sind mit RO_1 bzw. RO_2 gekennzeichnet. In den Spuren 1 und 12 sind die beiden Operatorfragmente ohne In10 Tet-Repressor aufgetragen. In den Spuren 2 bis 11 sind steigende Mengen an Repressor zugegeben worden, wobei das molare Repressor-Operator Verhältnis in den Spuren 2) 0,2:1; 3) 0,4:1; 4) 0,6:1; 5) 0,8:1; 6) 1:1; 7) 1,2:1; 8) 1,4:1; 9) 1,6:1; 10) 1:1; 11) 2,2:1 betrug.

Deutlicher wird dieser Effekt, wenn man das Autoradiogramm densitometrisch auswertet (s. Abb. 4.32). Dabei wird jede einzelne Spur mit einem Lichtstift abgefahren und das Bandenprofil mit den unterschiedlichen Intensitäten in Form einer Kurve ausgedruckt (Computerprogramm von Dr. G. Steger). Jetzt kann man genau verfolgen, daß das DNA-Fragment mit O_2 bei steigenden Mengen an Tn10 Tet-Repressor schneller verschwindet als das O_1 Operatorfragment und analog dazu das verzögerte O_2 Operatorfragment schneller an Intensität zunimmt als das DNA-Fragment mit O_1.

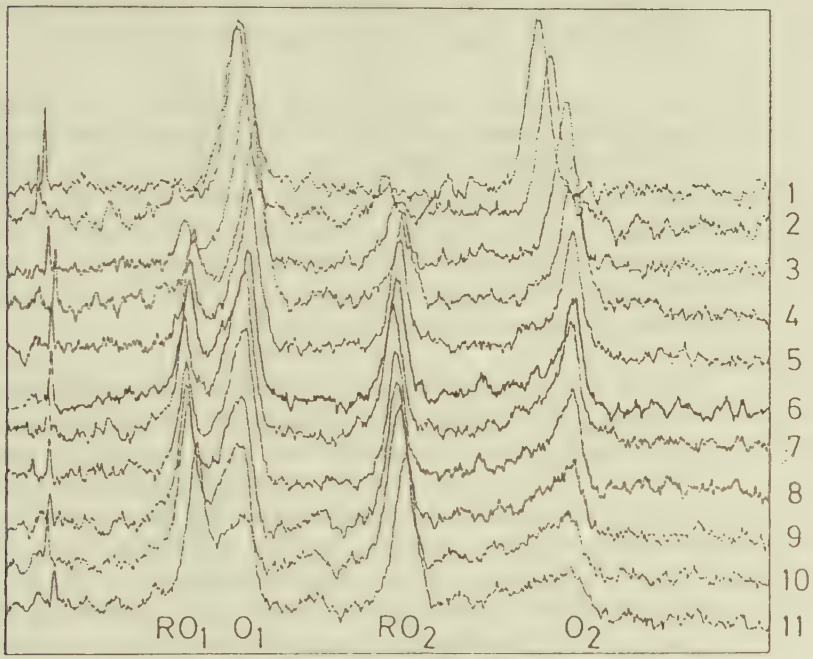


Abb. 4.32: Densitiometrische Auswertung des in Abb. 4.31 gezeigten Gelautoradiogramms
Die freien Operatorfragmente sind mit O_1 bzw. O_2 und die verzögerten Operatorfragmente mit RO_1 bzw. RO_2 gekennzeichnet. Die Zahlen am rechten Rand der Abbildung geben die jeweils gemessene Gelspur aus Abb. 4.31 an.

Für eine quantitative Auswertung dieser Experimente wurden die einzelnen DNA-Banden aus dem Gel ausgeschnitten und ihre Radioaktivität bestimmt. Die gemessenen cpm sind dabei ein Maß für die Menge an DNA-Fragment in der entsprechenden DNA-Bande. Diese Werte wurden dann in die unten angegebene Gleichung eingesetzt und K1/K2 bestimmt.

$$K1/K2 = \frac{[O_1R][O_2]}{[O_2R][O_1]}$$

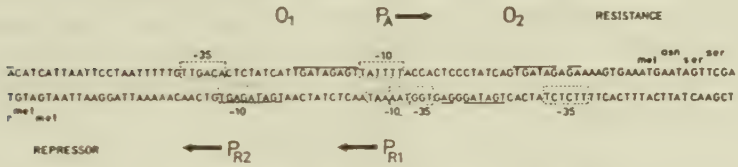
O_1R und O_2R bezeichnen dabei die Repressor-Operator Komplexe und O_1 und O_2 die jeweiligen freien DNA-Fragmente. Die ermittelten Werte für K1/K2 lagen bei den einzelnen Experimenten zwischen 0,5 und 0,22.

Das heißt, daß der Operator O_2 den Tn10 Tet-Repressor um den Faktor 2 bis 4,5 stärker bindet als der Operator O_1. Eine genauere Bestimmung des relativen Unterschieds der beiden Bindekonstanten war unter diesen experimentellen Bedingungen nicht möglich. Die DNA-Sequenz von O_1 und O_2 (s. Kap. 4.3) zeigt, daß für die unterschiedliche Bindekonstante der beiden Operatoren nur das unterschiedliche zentrale Basenpaar oder der Basenpaaraustausch an Position sieben in O_2 gerechnet vom palindromischen Zentrum aus verantwortlich sein kann.

Bei dem Vergleich der Intensitäten der unverzögerten oder verzögerten DNA-Banden von O_1 und O_2 im Kompetitionsexperiment bei steigenden Repressorkonzentrationen ist dieser Unterschied auf dem Autoradiogramm nur schwer feststellbar. Überträgt man diesen geringen Intensitätsunterschied der entsprechenden Bandenpaare auf die DNaseI Schutzexperimente (siehe Kap. 4.3), so wird man hier bei der weitaus komplexeren Anordnung von DNA-Banden einen solchen Unterschied nicht mehr feststellen können. Daraus wird deutlich, daß mit dieser Kombination von Experimenten die Frage nach der kooperativen Besetzung der beiden Operatoren im Wildtyp nicht endgültig geklärt werden kann.

4.5 Startpunkte der mRNA des tet-Repressorgens in vivo

In unserer Arbeitsgruppe wurden die Startpunkte der mRNAs für tetA und tetR durch in vitro Transkriptionsexperimente ermittelt (Hillen et al., 1984). Die gefundenen Promotoren, zwei für tetR, einer für tetA sind im oberen Teil der Abb. 4.3.3 mit der Sequenz wiedergegeben.



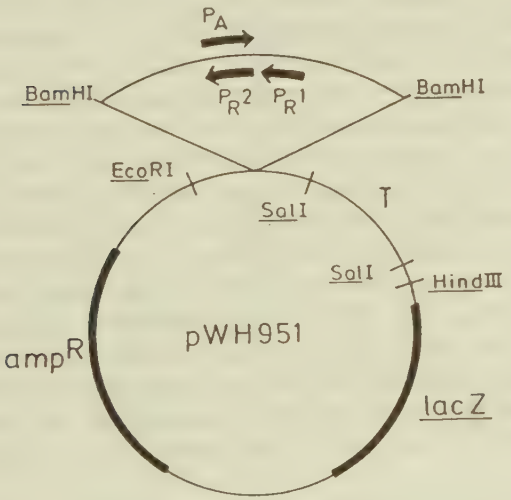


Abb. 4.33: Konstruktion des Plasmids pWH951
P_A ist der Promotor für tetA. P_R1 und P_R2 sind die beiden Promotoren für tetR. T kennzeichnet das Tn10 Terminatorfragment (s. Kap. 4.2).

Der mRNA Startpunkt des tetR Promotors P_R2 wurde durch S1 Analysen in vivo bestätigt (Bertrand et al., 1983). Eine mögliche Aktivität des Promotors P_R1 in vivo wurde in dieser Publikation nicht diskutiert. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit die Frage geklärt werden, ob der tetR Promotor P_R1 in vivo aktiv ist. Für die dafür durchgeführten S1 Analysen wurde das Plasmid pWH951 benutzt (s. Abb. 4.33). Es besitzt die Tn10 tet Kontrollregion von der AluI Stelle an Position minus 65 (Postle et al., 1984; ausgehend von der DNA-Sequenz in Anhang I) bis zur TaqI Stelle (Position 80, s. Anhang I) auf einem 142 bp langen BamHI Fragment. Die Transkriptonsrichtung von P_R1 und P_R2 ist zu der einzelnen EcoRI Stelle hin orientiert (Wray, Munson und Reznikoff, pers. Mitteilung).

Das Plasmid pWH951 wurde mit EcoRI linearisiert und nach einer Dephosphorylierung (Kap. 3.2) an seinen 5' Enden radioaktiv markiert (Kap. 3.4). Nach der Restriktion mit SalI wurde das kleinere, an der EcoRI Stelle radioaktiv markierte EcoRI-SalI Fragment von einem 5% Polyacrylamidgel eluiert, und 10.000 cpm (Cerencov) davon mit 140 µg Gesamt-RNA aus E.coli CSH26/pWH951 hybridisiert (s. Kap. 3.10). Die Endhybridisiertemperatur betrug 37°C und das Gemisch wurde bei dieser Temperatur für 10 Minuten mit 25-100 U S1 inkubiert. Das Ergebnis ist in Abb. 4.34 gezeigt. In Spur P ist das nach der Hybridisierung und S1 Behandlung mit 50 U S1 verbleibende DNA-Fragment aufgetragen. In Spur M sind die Produkte der Maxam-Gilbert G+A Reaktion des EcoRI-SalI Fragments aufgetragen. Die beiden Pfeile am rechten Rand der Abbildung kennzeichnen die in vitro gefundenen mRNA Startstellen P_R1 und P_R2 (Hillen et al., 1984). Aus dem S1 Experiment geht deutlich hervor, daß es einen Hauptstartpunkt der mRNA in Richtung tetR gibt. Dieser Startpunkt stimmt sehr gut mit den vorhandenen in vitro und in vivo Ergebnissen überein (Hillen et al., 1984; Bertrand et al., 1983).

Für den in vitro gefundenen Promotor P_R1 konnte in diesem in vivo Experiment nur eine sehr schwache Aktivität festgestellt werden (s. Pfeil in Abb. 4.34). Berücksichtigt man die Intensität des S1-Signals von P_R2 (siehe Pfeil, in Abb. 4.34), so kann die Aktivität des Promo-

tors P_R1 in vivo auf kleiner als 5% gegenüber P_R2 abgeschätzt werden.

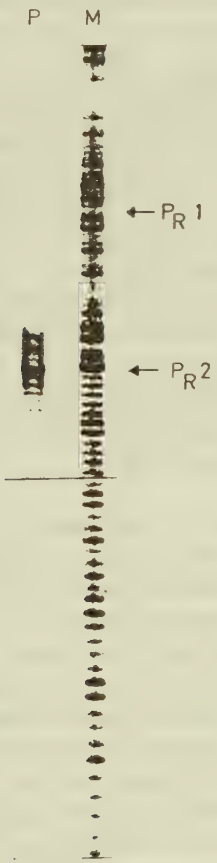


Abb. 4.34: S1 Experiment zur Ermittlung der mRNA Startstellen von tetR in vivo

5 DISKUSSION

Sequenzanalyse der Tn10 DNA vom Ende des tetA Gens bis zum rechten IS-Element

Die zentrale DNA-Sequenz zwischen den beiden IS-Elementen von Tn10 ist 6500 bp lang. Zwei für die Tetrazyklinresistenz wichtigen Gene sind dabei auf einem etwa 2000 bp großen HpaI Fragment angeordnet (Jorgensen und Reznikoff, 1979). Die verbleibenden DNA-Sequenzen, etwa 1000 bp zwischen tetA und dem rechten IS-Element und etwa 3500 bp zwischen tetR und dem linken IS-Element, werden auch über viele Transpositionsereignisse hinweg nicht deletiert (C. Beck, pers. Mitteilung). Weiterhin zeigen Hybridisierungen mit DNA-Fragmenten von Tn10 an die DNA anderer Tetrazyklinresistenzdeterminanten, daß viele davon eine ähnliche Größe wie Tn10 besitzen (S.B. Levy, pers. Mitteilung). Das läßt vermuten, daß auch auf den DNA-Bereichen zwischen tetA, tetR und den IS-Elementen Funktionen lokalisiert sind, die für die Bakterien einen Selektionsvorteil bieten.

Der einzige Hinweis auf eine mögliche Funktion der zwischen tetA und dem rechten IS-Element codierten Proteine ist eine Beteiligung an der Tetrazyklinresistenz (Shales et al., 1980). Da ein Molekül Tetrazyklin pro Ribosom ausreicht, um die Proteinbiosynthese zu inhibieren und es auch nur eine spezifische Tetrazyklinbindestelle an den E.coli Ribosomen gibt (Tritton, T.R., 1972), würde wahrscheinlich auch ein Protein genügen, um die Ribosomen vor dem Antibiotikum zu schützen. Dies könnte entweder durch den Austausch des entsprechenden sensitiven ribosomalen Proteins geschehen, oder durch eine Maskierung der ribosomalen Tetrazyklinbindestelle. Bisher konnte aber ein solches Protein in tetrazyklinresistenten Gram-negativen Bakterien noch nicht nachgewiesen werden. Einzig der Tetrazyklinproduzent Streptomyces rimosus besitzt neben einem Transportmechanismus ein weiteres mit Tetrazyklin induzierbares Protein, welches die Ribosomen vor dem Antibiotikum schützt (Ohnuki et al., 1985).

Die Sequenzanalyse der Tn10 DNA vom Ende des tetA Gens bis zum rechten IS-Element ergab zwei offene Leseraster. Die mRNAs für beide Leseraster starten an einer gemeinsamen DNA-Region mit entgegengesetzter Polarität. Die Ermittlung der mRNA Startpunkte zeigte, daß das offene Leseraster orfR komplett in vivo transkribiert wird. Bei orfL liegt der Promotor im offenen Leseraster, so daß von der maximalen Codierkapazität von 222 Aminosäuren mindestens die ersten 25 Aminosäuren nicht benutzt werden können. Das daraus errechnete maximale Molekulargewicht für das Protein von orfL beträgt 22,7 kDa und für das Protein von orfR 16,7 kDa. Die Codon-Benutzung dieser beiden offenen Leseraster ist sehr ähnlich zu der Codon-Benutzung von tetA und tetR (Hillen und Schollmeier, 1983; Postle et al., 1984). Dadurch gibt es keinen Grund zu der Annahme, daß orfR und orfL einen anderen phylogenetischen Ursprung besitzten als tetA und tetR.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die genetische Anordnung der Gene orfR und orfL im Vergleich zu allen anderen bisher bekannten Genen von Tn10 (siehe Abb. 5.1).

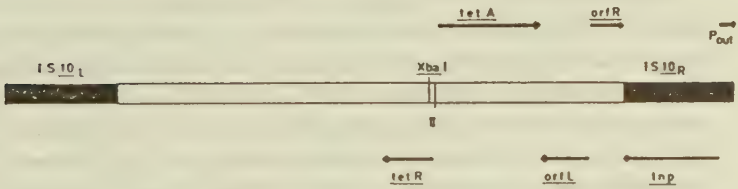


Abb. 5.1: Genetische Organisation auf Tn10

Bei tetA und tetR überlappen die Promotoren beider Gene (Hillen et al., 1984). Bei orfR und orfL überlappen die beiden mRNAs um 18 Nukleotide und bei den Promotoren P_{in} und P_{out} auf dem rechten IS-Element überlappen die mRNAs sogar um 34 Nukleotide (Halling et al., 1982). Alle drei Genpaare haben entgegengesetzte Polarität, wobei tetR, orfL und P_{in} die gleiche Orientierung besitzen. Daraus ergibt sich als mögliches Allgemeinprinzip für die genetische Organisation von Tn10 eine lückenlose Aneinanderreihung von Genpaaren. Zwei Gene starten dabei immer an einer gemeinsamen Startregion mit entgegengesetzter Polarität. Dadurch ist die Codierkapazität der Tn10 DNA sehr gut ausgenutzt.

Beck und Mitarbeiter konnten durch Translationsexperimente in Minizellen zeigen, daß auf der DNA-Region zwischen tetA und dem rechten IS-Element zwei Proteine, die sie tetC und tetD nennen, codiert sind (Braus et al., 1984). TetC hat ein apparentes Molekulargewicht von 23 kDa und besitzt auf Tn10 dieselbe Orientierung wie tetR. Der Promotor für das Gen von tetC wurde auf einem DNA-Bereich zwischen der BglII-Stelle an Position 1855 (siehe Anhang I) und dem rechten IS-Element lokalisiert. Da dadurch sowohl die Größe der Proteine als auch die Orientierung und die Promotoren der Gene von orfL und tetC übereinstimmen, ist orfL das Gen für das Protein TetC.

Das Protein TetD hat ein apparentes Molekulargewicht von 18 kDa und besitzt auf Tn10 dieselbe Orientierung wie tetA. In Minizellen ist die Expression von tetD durch das Tetrazyklinderivat 2 Acetyl-2-Decarboxyamid Tetrazyklin induzierbar. Beck und Mitarbeiter folgern daraus, daß tetD reguliert ist und sie vermuten, daß das Protein aufgrund des Induktors an der Tetrazyklinresistenz beteiligt ist. OrfR und das Gen für TetD besitzten somit eine identische Orientierung und die Molekulargewichte der beiden Proteine sind sehr ähnlich. Daher könnte orfR das Gen für das Protein TetD sein. Aufgrund der DNA-Sequenz ist eine Regulation von orfR alleine durch einen Lex A-Operator direkt am Beginn seines offenen Leserasters möglich. Dadurch würde aber das Genprodukt von orfR an die SOS Antwort von E.coli Zellen gekoppelt sein

(Ebina et al., 1983).

Vergleiche der Aminosäuresequenzen von orfl und orfR mit den Aminosäuresequenzen aller ribosomalen E.coli Proteine sowie mit den Aminosäuresequenzen verschiedener Repressoren und auch mit dem Tet-Repressor und dem Tetrazyklinresistenzprotein geben keinen Hinweis auf eine mögliche Funktion der Proteine von orfl und orfR (oder tetC, tetD). Analoge Vergleiche mit den Resistenzproteinen des Tetrazyklinproduzenten Streptomyces rimosus konnten bisher nicht durchgeführt werden, da die entsprechenden Sequenzdaten noch nicht vorliegen.

Zusammenfassend muß man daher sagen, daß über die Funktion der Proteine von orfl und orfR (tetC, tetD) noch nichts bekannt ist.

Termination der Transkription von tetA und orfl

Zwischen den carboxyterminalen Enden der Proteine von tetA und orfl wurde für die tetA Orientierung eine typische rho unabhängige Transkriptionsterminatorsequenz gefunden (Hillen und Schollmeier, 1983). Aufgrund dieser Sequenz kann die mRNA eine Stamm-Schleifen Sekundärstruktur mit einem acht Basenpaar langen Stamm und einer sechs Basen großen Schleife ausbilden. In tetA Orientierung befinden sich auf der DNA-Sequenz hinter dieser Sekundärstruktur sechs Thymidine in Folge. In der umgekehrten (orfl) Orientierung findet man hinter der möglichen Sekundärstruktur sieben Thymidine innerhalb der nächsten elf Basen. Daß solch eine DNA-Sequenz mit einem nicht perfekten oligo-T-Stück auch Terminationsaktivität besitzen kann, ist für einige Beispiele gezeigt (Brendel und Trifonov, 1984). Obwohl die Termination der Transkription in der Regel unidirektional ist (Holmes et al., 1983), sollte aufgrund des Sequenzvergleichs und der Tatsache, daß der mögliche Transkriptionsterminator genau zwischen den carboxyterminalen Enden von zwei offenen Leserastern liegt, diese DNA-Sequenz auf bifunktionelle Terminatoraktivität untersucht werden. Die Bestimmung der Terminatoraktivität und Terminatorstärke mit geeigneten in vivo Meßsystemen und die Bestimmung der mRNA Endpunkte in vivo zeigten, daß die

Tn10 DNA-Sequenz zwischen Position 1300 und 1337 einen bidirektionalen Transkriptionsterminator besitzt (siehe Anhang I). Die Endpunkte der beiden mRNAs liegen dabei fast symmetrisch zu der Stamm-Schleifen-Sekundärstruktur und die Durchleserate beträgt bei der tetA Orientierung zwischen 1% und 4% und bei der orfL Orientierung zwischen 7% und 22% (Schollmeier et al., 1985).

Diese Ergebnisse stehen nicht im Widerspruch zu den Daten von Zupancic und Mitarbeitern (1980) die zeigten, daß die Expression von tetR durch einen starken Phagenpromotor außerhalb von Tn10 verstärkt werden kann, wenn er die gleiche Orientierung besitzt wie tetR. Dieser Promotor liegt somit außerhalb des rechten IS-Elements und transkribiert den hier untersuchten Transkriptionsterminator in orfL-Orientierung (siehe auch Abb. 5.1). In dieser Orientierung besitzt der Transkriptionsterminator eine Durchleserate von 7% bis 22%. Das heißt, ungefähr jedes fünfte bis zehnte Molekül RNA-Polymerase überwindet das Terminationssignal und kann dadurch das Gen tetR transkribieren. Diese Transkription von tetR wird dann zusätzlich zu der eigenen Promotoraktivität von tetR gemessen. Diese Zunahme der Transkription wird um so deutlicher, je stärker der Promotor außerhalb von Tn10 ist.

Durch den bidirektionalen Terminator wird eine überlappende Transkription von tetA und orfL verhindert so daß die Translation der mRNAs nicht durch eine mögliche Basenpaarung beeinflußt werden kann (Mizuno et al., 1984). Auch ergibt sich aus der DNA-Sequenz kein offenes Leseraster hinter tetA bzw. orfL, für das eine Transkription nötig wäre (Hillen und Schollmeier, 1983; Schollmeier und Hillen, 1984). Das in Transkriptionsrichtung hinter tetA liegende Gen orfR und das hinter orfL liegende Gen tetR besitzt jeweils einen eigenen Promotor (siehe Abb. 5.1). Daraus folgt, daß es keinen biologischen Grund für die Transkription der nicht codierenden DNA-Stränge von tetA und orfL gibt.

Bisher sind nur wenige Beispiele für mögliche bidirektionale Transkriptionsterminatoren bekannt. So liegt der rrnD Terminator von

E.coli zwischen dem Gen für eine ribosomale RNA und dem Gen für das ribosomale Protein S9 (Nomura et al., 1983). In vitro Untersuchungen zur Termination der Transkription der beiden Gene haben gezeigt, daß diese DNA-Sequenz bidirektionale Terminatoraktivität besitzt (pers. Mitteilung in Postle und Good, 1983). Weiterhin ist der Hauptterminator T_1 des fd Phagen als bidirektionales Terminationssignal charakterisiert (Konings und Schoenmakers, 1978; Gentz et al., 1981). Das dritte Beispiel für einen bidirektionalen Transkriptionsterminator ist die Terminatorsequenz am 3' Ende des tonB Gens von E.coli (Postle und Good, 1983). Die beiden Endpunkte der mRNAs an dieser DNA-Sequenz sind durch S1-Analysen in vivo bestimmt worden (Postle und Good, Abstract aus Bacteriophage meeting, August 1984, Cold Spring Harbor Lab, New York). Vergleicht man die Sequenz dieser bidirektionalen Transkriptionsterminatoren, so hat nur der tonB Terminator identische DNA-Sequenzen in beiden Orientierungen hinter der Stamm-Schleifen-Sekundär-Struktur. Die anderen Terminatoren besitzen, genau wie der Tn10 Terminator, eine perfekte oligo T Sequenz in der einen Orientierung und eine A/T reiche Sequenz in der anderen Orientierung (Referenzen wie vorher).

Ein funktionaler Vergleich der beiden Gene oder Genprodukte, die auf Transkriptionsebene von dem jeweiligen Terminator getrennt werden, ist nur für den rrnD Terminator möglich. Die beiden flankierenden Gene codieren einmal für eine ribosomale RNA und in der entgegengesetzten Polarität für das Protein S9 der kleinen ribosomalen Untereinheit. Für alle anderen Terminatoren ist die Funktion von wenigstens einem Genprodukt bisher noch unbekannt.

Tn10 Tet-Repressor - tet-Operator Wechselwirkung

Der Tn10 Tet-Repressor schützt zwei 19 bp lange palindromische DNA-Sequenzen vor dem Angriff der DNaseI. Zwischen diesen beiden Operatoren sind fünf bis sechs Phosphodiesterbindungen für die DNaseI zugänglich. In den geschützten palindromischen DNA-Sequenzen werden ebenfalls vier Phosphodiesterbindungen von der DNaseI hydrolysiert. Dies

ist bei anderen durch DNaseI-Schutzexperimente untersuchten Protein-DNA-Komplexen schon beobachtet worden (Schmitz, A., 1981). Im Falle des Tn10 Tet-Repressor - tet-Operator Komplexes aber befinden sich die vier sensitiven Phosphodiesterbindungen an identischen Stellen des Palindroms zwischen dem Adenosin an Position vier und dem Thymidin an Position fünf, gerechnet vom palindromischen Zentrum. Aufgrund der identischen Umgebung dieser vier sensitiven Stellen kann die Zugänglichkeit der DNaseI zu den Phosphodiesterbindungen für die nähere Charakterisierung dieser Protein-DNA-Komplexe benutzt werden. Untersuchungen des Wildtyp Tet-Repressor - tet-Operator Komplexes haben gezeigt, daß die Phosphodiesterbindung an Position III (siehe Abb. 4.17) weitaus besser hydrolysiert wird, als die drei übrigen Phosphodiesterbindungen. Wie schon in Kapitel 4.3.1 diskutiert, gibt es für diese unterschiedliche Erkennung der benachbarten Repressor-Operator O_1 und Repressor-Operator O_2 Komplexe zwei prinzipiell mögliche Ursachen. Einmal bei der DNA-Sequenz das unterschiedliche zentrale Basenpaar von O_1 und O_2, oder der Basenpaaraustausch von A/T nach G/C an Position sieben des Operators O_2. Zum anderen eine Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Repressordimere, die die Repressor-Operator-Komplexe beeinflußt. Daß solch ein Proteinkontakt möglich ist, obwohl die DNaseI zwischen den beiden mit Tet-Repressor besetzten Operatoren einige Phosphodiesterbindungen hydrolysieren kann, ist bei den DNaseI Schutzexperimenten des Lambda-Repressors mit seinen Operatoren gezeigt worden. Hier werden die Operatoren O_R1 und O_R2 im Wildtyp von dem Lambda-Repressor cooperativ besetzt, wobei die carboxyterminalen Domänen des Lambda-Repressors miteinander wechselwirken. Trotzdem ist zwischen den Operatoren O_R1 und O_R2 eine Phosphodiesterbindung für die DNaseI zugänglich (Johnson et al., 1979). Der Abstand der beiden Operatoren O_R1 und O_R2 ist dabei sieben Basenpaare. Analog dazu werden bei den Tn10 Operatoren O_1 und O_2, die einen Abstand von elf Basenpaaren besitzen fünf bis sechs Phosphodiesterbindungen in Anwesenheit des Tet-Repressors hydrolisiert.

Um nun die unterschiedliche Besetzung der beiden Operatoren weiter zu untersuchen, wurden die Repressor-O_1 und Repressor-O_2 Komplexe ge-

trennt in einem DNaseI-Schutzexperiment untersucht. Die Experimente in Kapitel 4.3.2 und 4.3.3 zeigen deutlich, daß der voll palindromische Operator O_1 symmetrisch und der am siebten Basenpaar nicht palindromische Operator O_2 asymmetrisch von der DNaseI in Anwesenheit des Repressors erkannt wird. Dies bedeutet, daß für die unterschiedliche Besetzung von O_1 und O_2 nur die beiden oben diskutierten Sequenzunterschiede verantwortlich sein können.

Vergleicht man die Operator-DNA-Sequenz der Tetrazyklinresistenzdeterminanten von RP1 aus Klasse A (Waters et al., 1983), pSC101 aus Klasse C (Unger et al., 1984a) und RA1 aus Klasse D (Unger et al., 1984b) mit der Operator-DNA-Sequenz von Tn10 der Klasse B (Bertrand et al., 1983), so findet man einen streng homologen Bereich von Position eins bis fünf, gerechnet vom palindromischen Zentrum aus. Das zentrale Basenpaar selbst ist dagegen unter den verschiedenen Operatoren nicht homolog. Einen zweiten konservierten Bereich findet man an Position sechs bis neun der Palindrome. Hier sind die Basenpaare zwar nicht identisch, aber alle Operatoren besitzen die gleiche Purin-Pyrimidin-Verteilung (s. Abb. 5.2).

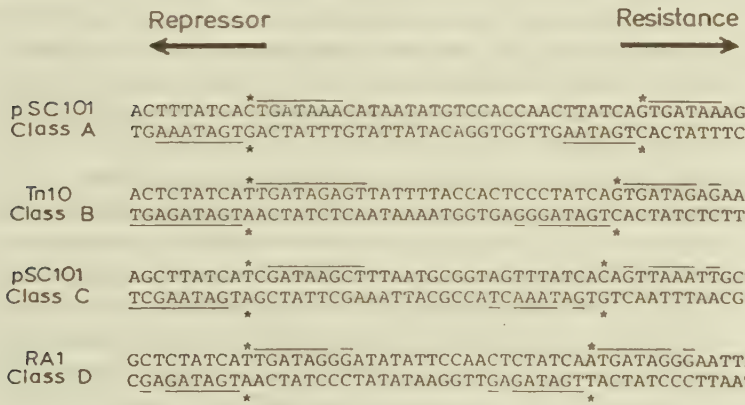


Abb. 5.2: Vergleich der Operator-DNA-Sequenz von vier verschiedenen Tetrazyklinresistenzdeterminanten

Da der Tn10 Tet-Repressor an alle vier Operatoren bindet (Klock et al., 1985), kann man jetzt den Sequenzvergleich dazu benutzen, die für die Erkennung des Repressors wichtigen Basen zu diskutieren.

DNA Bindeexperimente mit dem Tn10 Repressor und einer Operatormutante von O_2, bei der das zentrale Basenpaar deletiert ist, haben gezeigt, daß der Repressor eine um das zentrale Basenpaar verkürzte Operatorsequenz weniger gut erkennt (I. Meier, pers. Mitteilung). Daraus und aus dem Sequenzvergleich kann man folgern, daß das zentrale Basenpaar für die räumliche Anordnung der palindromischen DNA-Sequenz wichtig ist, daß aber für die spezifische Erkennung der DNA die Basen an Position eins bis neun im Operator verantwortlich sind. Daher ist es wahrscheinlich, daß der Basenpaaraustausch an Position sieben von O_2 gegenüber O_1 für die unterschiedliche Erkennung der Repressor-Operator-O_1- und Repressor-Operator-O_2-Komplexe verantwortlich ist.

Die DNaseI Schutzexperimente mit dem Tn10 Tet-Repressor und der Wildtyp-DNA im Vergleich zu den isolierten Tn10 Operatoren O_1 und O_2 geben auch einen Hinweis auf eine mögliche Protein-Protein-Wechselwirkung. Während nämlich der sensitive Schnitt an Position II im Wildtyp-Repressor-Operator-Komplex deutlich vorhanden ist, verschwindet die entsprechende Bande bei dem DNaseI Schutzexperiment mit dem isolierten Operator O_2 und dem Tet-Repressor fast vollkommen. Dieser Effekt auf dem mit dem Repressor besetzten Operator-O_2, kann jetzt nur auf eine Wechselwirkung des Repressor-Operator-O_2-Komplexes mit dem in Nachbarschaft befindlichen Repressor-Operator-O_1-Komplex zurückgeführt werden. Ob diese mögliche Wechselwirkung auf einem Protein-Protein-Kontakt beruht, sollte jetzt durch eine Veränderung des Abstandes der beiden Operatoren untersucht werden. Gibt es nämlich einen Protein-Protein-Kontakt zwischen den beiden Repressordimeren und bleibt dieser Kontakt bei einer Vergrößerung des Abstandes der beiden Operatoren erhalten, so muß sich die DNA biegen. Eine solche Schleifenbildung ist für den Gal-Repressor - gal-Operator Komplex (Majumdar und Adhya, 1984) und für die Wechselwirkung von CRP mit der lac- und gal Promotorregion postuliert (Fried und Crothers, 1983). Die Verzögerungsex-

perimente der Tet-Repressor - tet-Operator Komplexe wurden mit dem Wildtyp Operator und den Operatorabstandsmutanten durchgeführt. Bei den Mutanten waren die Abstände der beiden Operatoren O_1 und O_2 um +24, +29, +33, +88 und +96 Basenpaare gegenüber dem Wildtyp vergrößert. Dabei ergab sich aber keine unterschiedliche Verzögerungsstrecke auf 5% Polyacrylamidgelen gegenüber dem Wildtyp Repressor-Operator Komplex. Daher kann eine unter diesen experimentellen Bedingungen stabile Protein-Protein-Wechselwirkung ausgeschlossen werden.

Die Konstruktion der Abstandsmutante pWH971 mit der einzelnen BamHI Stelle zwischen den beiden Operatoren O_1 und O_2 von Tn10 war jetzt auch sehr gut dafür geeignet, exakte Kompetitionsexperimente zwischen den beiden Operatoren und dem Tn10 Tet-Repressor durchzuführen. Durch eine Linearisierung dieses Plasmids mit BamHI und einer anschließenden vollständigen Restriktion mit NcoI, einem Enzym das auf pWH971 zwei Erkennungsstellen besitzt (s. Kap. 4.4.5), konnten nämlich experimentelle Bedingungen geschaffen werden, die gewährleisten, daß die beiden Operatoren O_1 und O_2 auf getrennten DNA-Fragmenten in äquimolaren Mengen vorliegen. Die Ergebnisse zeigen, daß der Operator O_2 den Tn10 Tet-Repressor um den Faktor 2 bis 4,5 besser bindet als der Operator O_1. Daraus kann man aber nicht schließen, daß die gleichzeitige Besetzung von O_1 und O_2 im DNaseI Schutzexperiment auf eine kooperative Bindung zurückzuführen ist. Solch ein Unterschied in der Bindung ist wohl im DNaseI Experiment nicht zu sehen.

Die Lokalisierung der Operatoren für den Tet-Repressor haben dazu beigetragen die Regulation des Tetrazyklinresistenzoperons von Tn10 näher zu charakterisieren. Das Regulationsmodell der Tetrazyklinresistenz von Tn10 ist in Abb. 5.3 dargestellt. Es zeigt, daß der Tet-Repressor zwei palindromische DNA-Sequenzen in Abwesenheit des Antibiotikums Tetrazyklin besetzt und somit die Transkription von tetA und tetR inhibiert. Kommt der Induktor Tetrazyklin in die Zelle, verliert der Tet-Repressor seine DNA Bindefähigkeit und die RNA-Polymerase kann an die Promotoren P_R und P_A binden. Damit können die beiden Tetrazyklinresistenzgene exprimiert werden.

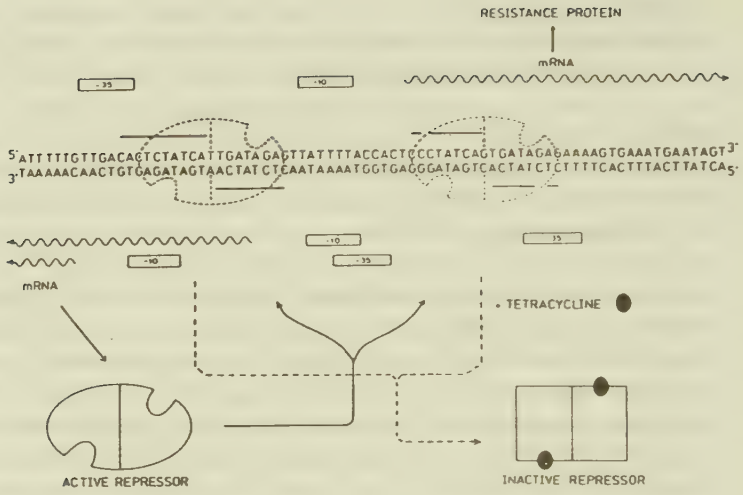


Abb. 5.3: Regulationsmodell der Tetrazyklinresistenz von Tn10

Startpunkte der mRNA des Tet-Repressors in vivo

Abgeleitet aus der Nukleotidsequenz der Kontrollregion des Tetrazyklinresistenzoperons auf Tn10 besitzt das tetR Gen zwei mögliche Promotoren, P_R1 und P_R2 (siehe Abb. 4.14). In vitro Transkriptionsexperimente haben gezeigt, daß beide Promotoren aktiv sind (Hillen et al., 1984). Die Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte durch S1 Analysen ergab, daß der Promotor P_R2 in vivo aktiv ist (Bertrand et al., 1983). Aus der Darstellung dieser Ergebnisse wurde aber nicht klar, ob auch der für P_R1 wichtige DNA-Bereich untersucht worden ist. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die Promotoraktivität von P_R1 und P_R2 durch S1-Analysen bestimmt. Dabei konnten die Ergebnisse von Bertrand und Mitarbeiter (1983) bestätigt und zusätzlich für P_R1 ein schwaches Promotorsignal gefunden werden. Vergleicht man die Signalstärken von P_R1

und P_R2 im S1-Experiment, so kann die Promotoraktivität von P_R1 relativ zu P_R2 auf weniger als 5% abgeschätzt werden. Diese gegenüber P_R2 wesentlich geringere Aktivität von P_R1 reicht aber aus, die Expression von tetR für die Regulation zu gewährleisten, wenn der Promotor P_R2 durch eine Mutation ausgefallen ist (C. Beck, pers. Mitteilung).

6 LITERATUR

Ball, P.G., Shales, S.W. und Chopra, I. (1980)
Plasmid - mediated tetracycline resistance in E.coli involves increased efflux of the antibiotic.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 93; 74-81.

Bertrand, K.P., Postle, K., Wray, L.V. und Reznikoff, W.S. (1983)
Overlapping divergent promotors control expression of Tn10 tetracycline restistance.
Gene 23; 149-156.

Bolivar, F., Rochriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. und Falkow, S. (1977)
Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system.
Gene 2; 95-113.

Braus, G., Argast, M. und Beck, C.F. (1984)
Identification of Additional Genes on Transposon Tn10: tetC and tetD.
J. Bacteriol. 160; 504-509.

Brendel, K. und Trifonov, E.N. (1984)
A computer algorithm for testing potential procaryotic terminators.
Nucl. Acids. Res. 12; 4411-4427.

Chopra, I., Shales, S.W., Ward, J.M. und Wallace, L.J. (1981)
Reduced expression of Tn10-mediated tetracycline resistance in E.coli containing more than one copy of the transposon.
J. Gen. Microbiol. 126; 45-54.

Clowes, R. (1972)
Molecular structure of bacterial plasmids.
Bacteriol. Rev. 36; 361-405.

Culard, F. und Maurizot, J.C. (1981)
Lac repressor-lac operator interaction. Circular dichroism study
Nucleic Acids. Res. 9; 5175-5184.

Falkow, S. (1975)
Infectious Multiple Drug Resistance.
Pion Ltd., London.

Franklin, T.J. (1967)
Resistance of Escherichia coli to tetracyclines. Changes in permeability to tetracyclines in Escherichia coli fearing transmissible resistance factors.
Biochem. J. 105; 371-378.

Franklin, T.J. und Rownd, R. (1973)
R-factor-mediated resistance to tetracycline in Proteus mirabilis.
J. Bacteriol. 115; 235-242.

Fried, M. und Crothers, M (1981)
Equilibria and Kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis.
Nucl. Acids Res. 9; 6505-6515.

Fritz, H.-J., Bicknäse, H., Gleumes, B., Heibach, C., Rosahl, S. und Ehring, R. (1983)
Characterization of two mutations in the E. coli gal E gene inactivating the second galactose operator and comparative studies of repressor binding.
EMBO J. 2; 2129-2135.

Galas, D.J. und Schmitz, A. (1978)
DNase I footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA bindung specificity.
Nucl. Acids Res. 5; 3157-3170.

Garner, M.M. und Revzin, A. (1981)
A gel electrophoresis method for quantifiying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system.
Nucl. Acids Res. 9; 3047-3060.

Gentz, R., Langner, A., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. und Bujard, H. (1981)
Cloning and analysis of strong promotors is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78; 4936-4940.

Greene, P.J., Heynecker, H.L., Bolivar, F., Rodrigues, R.L., Betlach, M.C., Covarribias, A.A., Backman, K., Russel, P.J., Tait, R., und Boyer, H.W. (1978)
A general method für the purification of restriction enzymes.
Nucl. Acids Res. 5; 2373-2380.

Grosjean, H. und Fiers, W. (1982)
Preferential codon usage in procaryotic genes: the optimal codon-anti-codon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes.
Gene 18; 199-209.

Halling, S.M., Simons, R.W., Way, J.C., Walsh, R.B. und Kleckner, N. (1982)
DNA sequence organisation of IS10-right of Tn10 and comparison with IS10-left.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79; 2608-2612.

Helinski, D.R. (1973)
Plasmid Determined Resistance to Antibiotics: molecular Properties of R Factors.
Ann. Rev. Microbiol. 27; 437-470.

Hershfield, V., Boyer, H.W., Chow, L., und Helinski, D.R. (1976)
Characterization of a mini-Col E1 plasmid.
J. Bacteriol. 126; 447-453.

Hillen, W., Klock, G., Kaffenberger, I., Wray, L.V. und Reznikoff, W.S. (1982)
Purification of the TET Repressor and TET Operator from the Transposon Tn10 and Characterization of their Interaction.
J. Biol. Chem. 257; 6605-6613.

Hillen, W., Schollmeier, K. und Gatz, C. (1984)
Control of Expression of the Tn10-encoded Tetracycline Resistance Operon. Interaction of RNA Polymerase and TET Repressor with the tet Operon Regulatory Region.
J. Mol. Biol. 172; 185-201.

Hillen, W., Klein, R.D. und Wells, R.D. (1981)
Preparation of Milligram Amounts of 21 Deoxyribonucleic Acid Restriction Fragments
Biochemistry 20; 3748-3756.

Hillen, W. und Schollmeier, K. (1983)
Nucleotide sequence of the Tn10 encoded tetracycline resistance gene.
Nucl. Acids Res. 11; 525-539.

Hillen, W., Gatz, C., Altschmied, L., Schollmeier, K. und Meier, I. (1983)
Control of Expression of the Tn10-encoded Tetracycline Resistance Genes. Equilibrium and Kinetic Investigation of the Regulatory Reactions.
J. Mol. Biol. 169; 707-721.

Hierowski, M. (1965)
Inhibition of Protein Synthesis by Chlortetracycline in the E.coli in vitro system.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 53; 594-599.

Holmes, W.M., Platt, T. und Rosenberg, M. (1983)
Termination of Transcription in E.coli.
Cell 32; 1029-1032.

Hovii, T., Ogawa, T. und Ogawa, H. (1981)
Nucleotide Sequence of the lexA Gene of E.coli.
Cell 23; 689-697.

Hu, S., Ohtsubo, E., Davidson, N. und Saedler, H. (1975)
Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among bacterial plasmids: identification and mapping of the insertion sequences IS1 and IS2 in F and R plasmids.
J. Bacteriol. 122; 764-775.

Irani, M.H., Ovosz, L. und Adhya, S. (1983)
A control element within a structural gene: the gal operon of E.coli.
Cell 32; 783-788.

Izaki, K., Kiuchi, K. und Arima, K. (1966)
Specificity and mechanism of tetracycline resistance in a multiple drug resistant strain of Escherichia coli.
J. Bacteriol. 91; 628-633.

Jacobsen, H., Klenow, H. und Overgaard-Hansen, K. (1974)
The N-terminal amino-acid-sequences of DNA polymerase I from Escherichia coli and of the large and the small fragments obtained by a limited proteolysis.
Eur. J. Biochem. 45; 623-627.

Jarolman, H., Hewel, O. und Kain, E. (1970)
Activity of Minocycline against R-factors carrying Enterobacteriaceae
Infect. Immun. 1; 321-326.

Johnson, A.D., Meyer, B.J. und Ptashne, M. (1979)
Interactions between DNA-bound repressors govern regulation by the lambda-phage repressor.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76; 5061-5065.

Johnson, R.A. und Walseth, T.F. (1979)
The enzymatic preparation of ^{32}P ATP; ^{32}P GTP; ^{32}P cAMP and ^{32}P cGMP, and their use in the assay of adenylate and guanylate cyclases and cyclic nucleotide phosphodiesterases.
Adv. Cyclic. Nucl. Res. 10; 135-167.

Jorgensen, R.A., Berg, D.E., and Reznikoff, W.S. (1978)
Genetic organisation in the transposable tetracycline resistance determinant Tn10.
In: Microbiology (D. Schlessinger Hrsg.), p 181-183, American Society for Microbiology, Washington D.C.

Jorgensen, R.A., Berg, D.E., Allez, B. und Reznikoff, W.S. (1979)
Restriction enzyme cleavage map of Tn10, a transposon which encodes tetracycline resistance.
J. Bacteriol. 137; 681-685.

Jorgensen, R.A. und Reznikoff, W.S. (1979)
Organization of Structural and Regulatory Genes that Mediate Tetracycline Resistance in Transposon Tn10.
J. Bacteriol. 138; 705-714.

Kelley, R.L. und Yanofsky, C. (1985)
Mutational studies with the trp repressor of Escherichia coli support the helix-turn-helix model of repressor recognition of operator DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82; 483-487.

Klein, R.D., Selsing, E. und Wells, R.D. (1980)
A rapid microscale technique for isolation of recombinant plasmid DNA suitable for restriction enzyme analysis.
Plasmid 3; 88-91.

Klock, G. (1982)
In: Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments
(H.G. Gassen and A.Lang, Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim.

Klock, G., Unger, B., Gatz, C., Hillen, W., Altenbuchner J., Schmid, K. und Schmitt, R. (1985).
Heterologous Repressor - Operator Recognition Among Four Classes of Tetracycline Resistance Determinants.
J. Bacteriol. 161; 326-332.

Kolb, A., Spassky, A., Chapon, C., Blazy, B. und Buc, H. (1983)
On the different binding affinities of CRP to the lac, gal and malT promotor regions.
Nucleic Acids Res. 11; 7833-7852.

Konings, R.N. und Schoenmakers, G.G. (1978)
In: The single stranded DNA phages.
(D.T. Denhard, D. Dressler and D.S. Ray, Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 507-530.

Last, J.A. (1969)
Binding of tetracycline to ribosomes.
Biochim. Biophys. Acta 195; 506-514.

Levy, S.B. und McMurray, C. (1974)
Detection of an inducible membrane protein associated with R-factor mediated tetracycline resistance.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 56; 1060-1068.

Levy, S.B., McMurray, C., Onigman, P. und Saunders, R.M. (1977)
In: Topics in Infectious Diseases (Drews, J. & Hogenauer, G., Hrsg.), Vol. 2, S. 181-206, Springer Verlag, Wien, New York.

Majumdar, A. und Adhya, S. (1984)
Demonstration of two operator elements in gal: in vitro repressor binding studies.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81; 6100-6104.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning: a laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory,
Cold Spring Harbor, New York.

Marshall, B., Tachibana, C. und Levy, S.B. (1983)
Frequency of Tetracycline Resistance Determinant Classes Among Lactose-Fermenting Coliforms
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 24; 835-840.

Maxam, A.M. und Gilbert, W. (1977)
A new method for sequencing DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74; 560-564.

Maxam, A.M. und Gilbert, W. (1980)
Sequencing End-Labeled DNA with Basespecific Chemical Cleavages.
Meth. Enzym. 65; 499-560.

McKenney, K., Shimatake, H., Court, D., Schmeissner, U., Brady, C. und Rosenberg, M. (1981)
In: Gene amplification and analysis (Chirikjian, J.G. und Papas, T.S., Hrsg.) Vol. II, S. 383-415, Elsevier-North Holland Press, Amsterdam.

McMurry, L.M., Petrucci, R. und Levy, S.B. (1980)
Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 77; 3974-3977.

Mendez, B., Tachibana, C. und Levy, S.B. (1980)
Heterogeneity of tetracycline resistance determinants
Plasmid 3; 99-108.

Miller, J.H. (1972)
Experiments in Molecular Genetics.
Cold Spring Harbor Laboratory,
Cold Spring Harbor, New York, 11724.

Mizuno, T., Chou, M.Y. und Inouye, M. (1984)
A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (mic RNA).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81; 1966-1970.

Nomura, M., Jinks-Robertson, S. und Miura, A. (1983)
Regulation of Ribosomal Biosynthesis in Escherichia coli.
In: Interaction of Translational and Transkriptional Controls in the Regulation of Gene Expression.
(M. Grunberg-Nanajo and B. Safer, Hrsg.), Elsevier Science Publishing Company, Inc. 1983.

Oehmichen, R., Klock, G., Altschmied, L. und Hillen W. (1984)
Construction of an E.coli strain overproducing the Tn10 encoded TET repressor and its use for large scale purification.
EMBO J. 3; 539-543.

O'Gorman, R.B., Dunaway, M. und Metthews, K.S. (1980)
DNA binding characteristics of lactose repressor and the trypsin-resistant core repressor.
J. Biol. Chem. 255; 10100-10106.

Ohnuki, T., Katoh, T., Imanaka, T. und Aiba, S. (1985)
Molecular Cloning of Tetracycline Resistance Genes from Streptomyces rimosus in Streptomyces griseus and Characterization of the Cloned Genes.
J. Bacteriol. 161; 1010-1016.

Oliver, T.J., Prokop, J.P., Bower, R.R. und Otto R.H. (1962)
Chelocardin - a new broad spectrum antibiotic. Discovery and biological properties.
Antimicrobial Agents Chemother. 583-591.

Pabo, C.O. und Sauer, R.T. (1984)
Protein-DNA Recognition
Ann. Rev. Biochem. 53; 293-321.

Peden, K.W.C. (1983)
Revised sequence of the tetracycline-resistance gene of pBR322.
Gene 22; 277-280.

Postle, K. und Good, R.F. (1983)
DNA sequence of the Escherichia coli ton B gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80; 5235-5239.

Postle, K., Nguyen, T.T. und Bertrand, K.P. (1984)
Nucleotide sequence of the repressor gene of the Tn10 tetracycline resistance determinant.
Nucl. Acids Res. 12; 4849-4863.

Ptashne, K. und Cohen, S.N. (1975)
Occurrence of insertion sequence (IS) regions on plasmid deoxyribonucleic acid as direct and inverted nucleotide sequence duplicaions.
J. Bacteriol. 122; 776-781.

Rosenberg, M. und Court, D. (1979)
Regulatory Sequences Involved in the Promotion and Termination of RNA Transcription.
Ann. Rev. Gen. 13; 319-353.

Rüther, U. (1982)
pUR250 allows rapid chemical sequencing of both DNA strands of its inserts.
Nucl. Acids Res. 10; 5765-5771.

Rüther, U., Koenen, M., Otto, K. und Müller-Hill, B. (1981)
pUR222, a vector for cloning and rapid chemical sequencing of DNA.
Nucl. Acids Res. 9; 4087-4098.

Schmitz, A., (1981)
Cyclic AMP receptor protein interacts with lactose operator DNA.
Nucl. Acids. Res. 9; 277-292.

Schollmeier, K. und Hillen W. (1984)
Transposon Tn10 Contains Two Structural Genes with Opposite Polarity Between tetA and $IS10_R$
J. Bacteriol. 160; 499-503.

Schollmeier, K., Gärtner, D. und Hillen W. (1985)
A Bidirectionally Active Signal for Termination of Transcription is located Between tetA and orfL on Transposon Tn10.
Nucl. Acids Res., eingereicht.

Shales, S.W., Chopra, I. und Ball, R.R. (1980)
Evidence for more than one mechanism of plasmid-determined tetracycline resistance in E.coli.
J. Gen. Microbiol. 121; 221-229.

Siebenlist, U., Simpson, R.B. und Gilbert, W. (1980)
E.coli RNA Polymerase interacts homologously with two different Promotors.
Cell 20; 269-281.

Suarez, G. und Nathans, D. (1965)
Inhibition of aminoacyl-sol. ribonucleic acid binding to ribosomes by tetracycline.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 18; 743-750.

Sutcliffe, J.G. (1978)
Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43; 77-90.

Suzuka, I., Kaji, H. und Kaji, A. (1966)
Binding of specific sRNA to 30 Ribosomal subunits: Effect of 50S Ribosomal subunits.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55; 1483-1490.

Tritton, T.R. (1977)
Ribosome - tetracycline interaction.
Biochemistry 16; 4133-4138.

Unger, B., Becker, J. und Hillen, W. (1984a)
Nucleotide sequence of the gene, protein purification and characterization of the pSC101-encoded tetracycline resistance-gene-repressor.
Gene 31; 103-108.

Unger, B., Klock, G. und Hillen, W. (1984b)
Nucleotide sequence of the repressor gene of the RA1 tetracycline resistance determinant: structural and functional comparison with three related Tet repressor genes.
Nucl. Acids Res. 12; 7693-7703.

Waters, S.H., Rogowsky, P., Grinsted, J., Altenbuchner, J. und Schmitt, R. (1983)
The tetracycline resistance determinants of RP1 and Tn1721: nucleotide sequence analysis.
Nucl. Acids Res. 11; 6089-6105.

Werner, R., Kollak, A., Nierhaus, D., Schreiner, G. und Nierhaus, K.H. (1975)
Binding sites and the action of some antibiotics which inhibit ribosomal functions.
Top. Infect. Dis. 1; 217-234.

Williams, G. und Smith, I. (1979)
Chromosomal Mutations Causing Resistance to Tetracycline in Bacillus subtilis.
Mol. Gen. Genet 177; 23-29.

Wray, L.V., Jr., Jorgensen, R.A. und Reznikoff, W.S. (1981)
Identification of the tetracycline promotor and repressor in transposon Tn10
J. Bacteriol. 147; 297-304.

Wray, L.V. und Reznikoff, W.S. (1983)
Identification of the Repressor Binding sites Controlling the Expression of Tetracycline Resistance Encoded by Tn10.
J. Bacteriol. 156; 1188-1191.

Yang, H.-L., Zubay, G. und Levy, S.B. (1976)
Synthesis of an R plasmid protein associated with tetracycline resistance is negatively regulated.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73; 1509-1512.

Zupancic, T.J., King, S.R., Pogue-Geile, K.L. und Jaskunas, S.R. (1980)
Identification of a second tetracycline-inducible polypeptide encoded by Tn10
J. Bacteriol. 144; 346-355.

```
AspThrLeuSerLeuIleGluLeuPheTyrHisSerLeuSerValIleGluLysSerGlu
 ThrLeuTyrHis******SerTyrPheThrThrProTyrGln******ArgLysValLys
  HisSerIleIleAspArgValIleLeuProLeuProIleSerAspArgGluLys***Asn

          10        20        30        40        50        60
GACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAA
CTGTGAGATAGTAACTATCTCAATAAAATGGTGAGGGATAGTCACTATCTCTTTTCACTT

ValSer******GlnTyrLeu***LysValValGly******HisTyrLeuPheThrPhe
 CysGluIleMetSerLeuThrIleLysGlySerGlyIleLeuSerLeuSerPheHisPhe
  ValArgAspAsnIleSerAsnAsn***TrpGluArgAspThrIleSerPheLeuSerIle
```

```
 MetAsnSerSerThrLysIleAlaLeuValIleThrLeuLeuAspAlaMetGlyIleGly
  ***IleValArgGlnArgSerHisTrp***LeuArgTyrSerMetProTrpGlyLeuAla
   Glu***PheAspLysAspArgIleGlyAsnTyrValThrArgCysHisGlyAspTrpPro

          70        80        90       100       110       120
ATGAATAGTTCGACAAAGATCGCATTGGTAATTACGTTACTCGATGCCATGGGGATTGGC
TACTTATCAAGCTGTTTCTAGCGTAACCATTAATGCAATGAGCTACGGTACCCCTAACCG

HisIleThrArgCysLeuAspCysGlnTyrAsnArg***GluIleGlyHisProAsnAla
 SerTyrAsnSerLeuSerArgMetProLeu***ThrValArgHisTrpProSerGlnGly
  PheLeuGluValPheIleAlaAsnThrIleValAsnSerSerAlaMetProIleProArg
```

```
 LeuIleMetProValLeuProThrLeuLeuArgGluPheIleAlaSerGluAspIleAla
  LeuSerCysGlnSerCysGlnArgTyrTyrValAsnLeuLeuLeuArgLysIleSerLeu
   TyrHisAlaSerLeuAlaAsnValIleThr***IleTyrCysPheGlyArgTyrArg***

          130       140       150       160       170       180
CTTATCATGCCAGTCTTGCCAACGTTATTACGTGAATTTATTGCTTCGGAAGATATCGCT
GAATAGTACGGTCAGAACGGTTGCAATAATGCACTTAAATAACGAAGCCTTCTATAGCGA

LysAspHisTrpAspGlnTrpArg******ThrPheLysAsnSerArgPheIleAspSer
 ******AlaLeuArgAlaLeuThrIleValHisIle***GlnLysProLeuTyrArg***
  IleMetGlyThrLysGlyValAsnAsnArgSerAsnIleAlaGluSerSerIleAlaLeu
```

```
 AsnHisPheGlyValLeuLeuAlaLeuTyrAlaLeuMetGlnValIlePheAlaProTrp
  ThrThrLeuAlaTyrCysLeuHisPheMetArg***CysArgLeuSerLeuLeuLeuGly
   ProLeuTrpArgIleAlaCysThrLeuCysValAsnAlaGlyTyrLeuCysSerLeuAla

          190       200       210       220       230       240
AACCACTTTGGCGTATTGCTTGCACTTTATGCGTTAATGCAGGTTATCTTTGCTCCTTGG
TTGGTGAAACCGCATAACGAACGTGAAATACGCAATTACGTCCAATAGAAACGAGGAACC

ValValLysAlaTyrGlnLysCysLysIleArg***HisLeuAsnAspLysSerArgPro
 GlySerGlnArgIleAlaGlnValLysHisThrLeuAlaPro***ArgGlnGluLysAla
  TrpLysProThrAsnSerAlaSer***AlaAsnIleCysThrIleLysAlaGlyGlnSer
```

```
LeuGlyLysMetSerAspArgPheGlyArgArgProValLeuLeuLeuSerLeuIleGly
 LeuGluLysCysLeuThrAspLeuValGlyAlaGlnCysCysCysCysHis******Ala
  TrpLysAsnVal***ProIleTrpSerAlaProSerAlaValValValIleAsnArgArg

          250        260        270        280        290        300
CTTGGAAAAATGTCTGACCGATTTGGTCGGCGCCCAGTGCTGTTGTTGTCATTAATAGGC
GAACCTTTTTACAGACTGGCTAAACCAGCCGCGGGTCACGACAACAACAGTAATTATCCG

LysSerPheHisArgValSerLysThrProAlaTrpHisGlnGlnGln******TyrAla
 GlnPhePheThrGlnGlyIleGlnAspAlaGlyLeuAlaThrThrThrMetLeuLeuArg
  ProPheIleAspSerArgAsnProArgArgGlyThrSerAsnAsnAspAsnIleProAla

---

AlaSerLeuAspTyrLeuLeuLeuAlaPheSerSerAlaLeuTrpMetLeuTyrLeuGly
 HisArgTrpIleThrTyrCysTrpLeuPheGlnValArgPheGlyCysCysIle***Ala
  IleAlaGlyLeuLeuIleAlaGlyPhePheLysCysAlaLeuAspAlaValPheArgPro

          310        320        330        340        350        360
GCATCGCTGGATTACTTATTGCTGGCTTTTTCAAGTGCGCTTTGGATGCTGTATTTAGGC
CGTAGCGACCTAATGAATAACGACCGAAAAAGTTCACGCGAAACCTACGACATAAATCCG

CysArgGlnIleVal***GlnGlnSerLys***ThrArgLysProHisGlnIle***Ala
 MetAlaProAsnSerIleAlaProLysLysLeuHisAlaLysSerAlaThrAsnLeuGly
  AspSerSer***LysAsnSerAlaLysGluLeuAlaSerGlnIleSerTyrLysProArg

---

ArgLeuLeuSerGlyIleThrGlyAlaThrGlyAlaValAlaAlaSerValIleAlaAsp
 ValCysPheGlnGlySerGlnGluLeuLeuGlyLeuSerArgHisArgSerLeuProIle
  PheAlaPheArgAspHisArgSerTyrTrpGlyCysArgGlyIleGlyHisCysArgTyr

          370        380        390        400        410        420
CGTTTGCTTTCAGGGATCACAGGAGCTACTGGGGCTGTCGCGGCATCGGTCATTGCCGAT
GCAAACGAAAGTCCCTAGTGTCCTCGATGACCCCGACAGCGCCGTAGCCAGTAACGGCTA

ThrGlnLys***ProAspCysSerSerSerProSerAspArgCysArgAspAsnGlyIle
 AsnAlaLysLeuSer***LeuLeu***GlnProGlnArgProMetPro***GlnArgTyr
  LysSerGluProIleValProAlaValProAlaThrAlaAlaAspThrMetAlaSerVal

---

ThrThrSerAlaSerGlnArgValLysTrpPheGlyTrpLeuGlyAlaSerPheGlyLeu
 ProProGlnLeuLeuAsnAla***SerGlySerValGly***GlyGlnValLeuGlyLeu
  HisLeuSerPheSerThrArgGluValValArgLeuValArgGlyLysPheTrpAlaTrp

          430        440        450        460        470        480
ACCACCTCAGCTTCTCAACGCGTGAAGTGGTTCGGTTGGTTAGGGGCAAGTTTTGGGCTT
TGGTGGAGTCGAAGAGTTGCGCACTTCACCAAGCCAACCAATCCCCGTTCAAAACCCGAA

GlyGly***SerArgLeuAlaHisLeuProGluThrPro***ProCysThrLysProLys
 TrpArgLeuLysGluValArgSerThrThrArgAsnThrLeuProLeuAsnGlnAlaGln
  ValGluAlaGlu***ArgThrPheHisAsnProGlnAsnProAlaLeuLysProSerPro
```

```
GlyLeuIleAlaGlyProIleIleGlyGlyPheAlaGlyGluIleSerProHisSerPro
  Val******ArgGlyLeuLeuLeuValValLeuGlnGluArgPheHisArgIleValPro
   PheAsnSerGlyAlaTyrTyrTrpTrpPheCysArgArgAspPheThrAla***SerLeu

          490        500        510        520        530        540
GGTTTAATAGCGGGGCCTATTATTGGTGGTTTTGCAGGAGAGATTTCACCGCATAGTCCC
CCAAATTATCGCCCCGGATAATAACCACCAAAACGTCCTCTCTAAAGTGGCGTATCAGGG

Thr***TyrArgProArgAsnAsnThrThrLysCysSerLeuAsn***ArgMetThrGly
 AsnLeuLeuProAla******GlnHisAsnGlnLeuLeuSerLysValAlaTyrAspArg
  LysIleAlaProGlyIleIleProProLysAlaProSerIleGluGlyCysLeuGlyLys
```

```
PhePheIleAlaAlaLeuLeuAsnIleValThrPheLeuValValMetPheTrpPheArg
  PheLeuSerLeuArgCys***IleLeuSerLeuSerLeuTrpLeuCysPheGlySerVal
   PheTyrArgCysValAlaLysTyrCysHisPheProCysGlyTyrValLeuValPro***

          550        560        570        580        590        600
TTTTTTATCGCTGCGTTGCTAAATATTGTCACTTTCCTTGTGGTTATGTTTTGGTTCCGT
AAAAAATAGCGACGCAACGATTTATAACAGTGAAAGGAACACCAATACAAAACCAAGGCA

LysLysAspSerArgGln***IleAsnAspSerGluLysHisAsnHisLysProGluThr
 Lys***ArgGlnThrAlaLeuTyrGln***LysGlyGlnPro***ThrLysThrGlyHis
  LysIleAlaAlaAsnSerPheIleThrValLysArgThrThrIleAsnGlnAsnArgSer
```

```
GluThrLysAsnThrArgAspAsnThrAspThrGluValGlyValGluThrGlnSerAsn
  LysProLysIleHisValIleIleGlnIleProLys***GlyLeuArgArgAsnArgIle
   AsnGlnLysTyrThr******TyrArgTyrArgSerArgGly***AspAlaIleGluPhe

          610        620        630        640        650        660
GAAACCAAAAATACACGTGATAATACAGATACCGAAGTAGGGGTTGAGACGCAATCGAAT
CTTTGGTTTTTATGTGCACTATTATGTCTATGGCTTCATCCCCAACTCTGCGTTAGCTTA

PheGlyPheIleCysThrIleIleCysIleGlyPheTyrProAsnLeuArgLeuArgIle
 PheTrpPheTyrValHisTyrTyrLeuTyrArgLeuLeuProGlnSerAlaIleSerAsn
  ValLeuPheValArgSerLeuValSerValSerThrProThrSerValCysAspPheGlu
```

```
SerValTyrIleThrLeuPheLysThrMetProIleLeuLeuIleIleTyrPheSerAla
  ArgTyrThrSerLeuTyrLeuLysArgCysProPheCys***LeuPheIlePheGlnArg
   GlyIleHisHisPheIle***AsnAspAlaHisPheValAspTyrLeuPhePheSerAla

          670        680        690        700        710        720
TCGGTATACATCACTTTATTTAAAACGATGCCCATTTTGTTGATTATTTATTTTTCAGCG
AGCCATATGTAGTGAAATAAATTTTGCTACGGGTAAAACAACTAATAAATAAAAAGTCGC

ArgTyrValAspSer***LysPheArgHisGlyAsnGlnGlnAsnAsnIleLys***Arg
 ProIleCys***LysIle***PheSerAlaTrpLysThrSer***LysAsnLysLeuAla
  ThrTyrMetValLysAsnLeuValIleGlyMetLysAsnIleIle***LysGluAlaCys
```

```
GlnLeuIleGlyGlnIleProAlaThrValTrpValLeuPheThrGluAsnArgPheGly
 Asn******AlaLysPheProGlnArgCysGlyCysTyrLeuProLysIleValLeuAsp
  IleAspArgProAsnSerArgAsnGlyValGlyAlaIleTyrArgLysSerPheTrpMet

          730        740        750        760        770        780
CAATTGATAGGCCAAATTCCCGCAACGGTGTGGGTGCTATTTACCGAAAATCGTTTTGGA
GTTAACTATCCGGTTTAAGGGCGTTGCCACACCCACGATAAATGGCTTTTAGCAAAACCT

LeuGlnTyrAlaLeuAsnGlyCysArgHisProHis***LysGlyPheIleThrLysSer
 IleSerLeuGlyPheGluArgLeuProThrProAlaIle***ArgPheAspAsnGlnIle
  AsnIleProTrpIleGlyAlaValThrHisThrSerAsnValSerPheArgLysProHis
```

```
TrpAsnSerMetMetValGlyPheSerLeuAlaGlyLeuGlyLeuLeuHisSerValPhe
 GlyIleAla***TrpLeuAlaPheHis***ArgValLeuValPheTyrThrGlnTyrSer
  Glu***HisAspGlyTrpLeuPheIleSerGlySerTrpSerPheThrLeuSerIlePro

          790        800        810        820        830        840
TGGAATAGCATGATGGTTGGCTTTTCATTAGCGGGTCTTGGTCTTTTACACTCAGTATTC
ACCTTATCGTACTACCAACCGAAAAGTAATCGCCCAGAACCAGAAAATGTGAGTCATAAG

ProIleAlaHisHisAsnAlaLys******ArgThrLysThrLys***Val***TyrGlu
 SerTyrCysSerProGlnSerLysMetLeuProAspGlnAspLysValSerLeuIleGly
  PheLeuMetIleThrProLysGluAsnAlaProArgProArgLysCysGluThrAsnTrp
```

```
GlnAlaPheValAlaGlyArgIleAlaThrLysTrpGlyGluLysThrAlaValLeuLeu
 LysProLeuTrpGlnGluGlu***ProLeuAsnGlyAlaLysLysArgGlnTyrCysSer
  SerLeuCysGlyArgLysAsnSerHis***MetGlyArgLysAsnGlySerThrAlaArg

          850        860        870        880        890        900
CAAGCCTTTGTGGCAGGAAGAATAGCCACTAAATGGGGCGAAAAAACGGCAGTACTGCTC
GTTCGGAAACACCGTCCTTCTTATCGGTGATTTACCCCGCTTTTTTGCCGTCATGACGAG

LeuGlyLysHisCysSerSerTyrGlySerPheProAlaPhePheArgCysTyrGlnGlu
 LeuArgGlnProLeuPhePheLeuTrp***IleProArgPhePheProLeuValAlaArg
  AlaLysThrAlaProLeuIleAlaValLeuHisProSerPheValAlaThrSerSerPro
```

```
GlyPheIleAlaAspSerSerAlaPheAlaPheLeuAlaPheIleSerGluGlyTrpLeu
 AspLeuLeuGlnIleValValHisLeuProPhe***ArgLeuTyrLeuLysValGly***
  IleTyrCysArg******CysIleCysLeuPheSerValTyrIle***ArgLeuValSer

          910        920        930        940        950        960
GGATTTATTGCAGATAGTAGTGCATTTGCCTTTTTAGCGTTTATATCTGAAGGTTGGTTA
CCTAAATAACGTCTATCATCACGTAAACGGAAAAATCGCAAATATAGACTTCCAACCAAT

SerLysAsnCysIleThrThrCysLysGlyLys***ArgLysTyrArgPheThrPro***
 Ile***GlnLeuTyrTyrHisMetGlnArgLysLeuThr***IleGlnLeuAsnThrLeu
  AsnIleAlaSerLeuLeuAlaAsnAlaLysLysAlaAsnIleAspSerProGlnAsnThr
```

ValPheProValLeuIleLeuLeuAlaGlyGlyGlyIleAlaLeuProAlaLeuGlnGly
PheSerLeuPhe***PheTyrTrpLeuValValGlySerLeuTyrLeuHisTyrArgGlu
PheProCysPheAsnPheIleGlyTrpTrpTrpAspArgPheThrCysIleThrGlySer
970 980 990 1000 1010 1020
GTTTTCCCTGTTTTAATTTTATTGGCTGGTGGTGGGATCGCTTTACCTGCATTACAGGGA
CAAAAGGGACAAAATTAAAATAACCGACCACCACCCTAGCGAAATGGACGTAATGTCCCT
AsnGluArgAsn***Asn***GlnSerThrThrProAspSer***ArgCys***LeuSer
LysGlyGlnLysLeuLysIleProGlnHisHisSerArgLysValGlnMetValProLeu
LysGlyThrLysIleLysAsnAlaProProProIleAlaLysGlyAlaAsnCysProThr
ValMetSerIleGlnThrLysSerHisGlnGlnGlyAlaLeuGlnGlyLeuLeuValSer
CysLeuSerLysGlnArgValIleSerLysValLeuTyrArgAspTyrTrpAla
AspValTyrProAsnLysGluSerSerAlaArgCysPheThrGlyIleIleGlyGluPro
1030 1040 1050 1060 1070 1080
GTGATGTCTATCCAAACAAAGAGTCATCAGCAAGGTGCTTTACAGGGATTATTGGTGAGC
CACTACAGATAGGTTTGTTTCTCAGTAGTCGTTCCACGAAATGTCCCTAATAACCACTCG
HisHisArgAspLeuCysLeuThrMetLeuLeuThrSer***LeuSer***GlnHisAla
SerThr***GlyPheLeuSerAspAspAlaLeuHisLysValProIleIleProSerGly
IleAspIleTrpValPheLeu******CysProAlaLysCysProAsnAsnThrLeuArg
LeuThrAsnAlaThrGlyValIleGlyProLeuLeuPheAlaValIleTyrAsnHisSer
LeuProMetGlnProValLeuLeuAlaHisTyrCysLeuLeuLeuPheIleIleIleHis
TyrGlnCysAsnArgCysTyrTrpProIleThrValCysCysTyrLeu***SerPheThr
1090 1100 1110 1120 1130 1140
CTTACCAATGCAACCCGTGTTATTGGCCCATTACTGTTTGCTGTTATTTATAATCATTCA
GAATGGTTACGTTGGCCACAATAACCGGGTAATGACAAACGACAATAAATATTAGTAAGT
LysGlyIleCysGlyThrAsnAsnAlaTrp***GlnLysSerAsnAsnIleIleMet***
TrpHisLeuArgHisGlnGlyMetValThrGlnGln***LysTyrAspAsnVal
ValLeuAlaValProThrIleProGlyAsnSerAsnAlaThrIle***Leu***GluSer
LeuProIleTrpAspGlyTrpIleTrpIleIleGlyLeuAlaPheTyrCysIleIleIle
TyrGlnPheGlyMetAlaGlyPheGlyLeuLeuVal***ArgPheThrValLeuLeuSer
ThrAsnLeuGlyTrpLeuAspLeuAspTyrTrpPheSerValLeuLeuTyrTyrTyrPro
1150 1160 1170 1180 1190 1200
CTACCAATTTGGGATGGCTGGATTTGGATTATTGGTTTAGCGTTTTACTGTATTATTATC
GATGGTTAAACCCTACCGACCTAAACCTAATAACCAAATCGCAAAATGACATAATAATAG
TrpAsnProIleAlaProAsnProAsnAsnThrArgLysValThrAsnAsnAsp
ValLeuLysProHisSerSerLysSer***GlnAsnLeuThrLysSerTyr******Gly
GlyIleGlnSerProGlnIleGlnIleIleProLysAlaAsn***GlnIleIleIleArg

```
LeuLeuSerMetThrPheMetLeuThrProGlnAlaGlnGlySerLysGlnGluThrSer
 CysTyrArg***ProSerCys***ProLeuLysLeuArgGlyValAsnArgArgGlnVal
  AlaIleAspAspLeuHisValAsnProSerSerSerGlyGlu***ThrGlyAspLysCys

         1210       1220       1230       1240       1250       1260
CTGCTATCGATGACCTTCATGTTAACCCCTCAAGCTCAGGGGAGTAAACAGGAGACAAGT
GACGATAGCTACTGGAAGTACAATTGGGGAGTTCGAGTCCCCTCATTTGTCCTCTGTTCA

Gln***ArgHisGlyGluHis***GlyArgLeuSerLeuProThrPheLeuLeuCysThr
 AlaIleSerSerArg***ThrLeuGlyGluLeuGluProSerTyrValProSerLeuHis
  SerAspIleValLysMetAsnValGly***Ala***ProLeuLeuCysSerValLeuAla

---

Ala***LeuPheArgHisGlnMetMetLeuPheArgGluIle******ProSer******
 LeuSerTyrPheValThrLys***CysTyrSerAlaLysTyrAsnAspProLeuAspAsn
  LeuValIleSerSerProAsnAspValIleProArgAsnIleMetThrLeuLeuIleThr

         1270       1280       1290       1300       1310       1320
GCTTAGTTATTTCGTCACCAAATGATGTTATTCCGCGAAATATAATGACCCTCTTGATAA
CGAATCAATAAAGCAGTGGTTTACTACAATAAGGCGCTTTATATTACTGGGAGAACTATT

SerLeu***LysThrValLeuHisHis***GluAlaPheTyrLeuSerGlyArgSerLeu
 LysThrIleGluAspGlyPheSerThrIleGlyArgPheIleIleValArgLysIleVal
  ***AsnAsnArg***TrpIleIleAsnAsnArgSerIleTyrHisGlyGluGlnTyrGly

---

ProLysArgAlaPhePheThrIleLysLysIle***LeuGlnIleLysProIleTyrPhe
 ProArgGlyHisPheLeuArg***ArgArgPheSerPheLys***AsnLeuSerIleLeu
  GlnGluGlyIlePheTyrAspLysGluAspLeuAlaSerAsnLysThrTyrLeuPheTyr

         1330       1340       1350       1360       1370       1380
CCCAAGAGGGCATTTTTTACGATAAAGAAGATTTAGCTTCAAATAAAACCTATCTATTTT
GGGTTCTCCCGTAAAAAATGCTATTTCTTCTAAATCGAAGTTTATTTTGGATAGATAAAA

GlyLeuProCysLysLysArgTyrLeuLeuAsnLeuLysLeuTyrPheArgAspIleLys
 TrpSerProMetLys***SerLeuSerSerLysAlaGluPheLeuVal***ArgAsn***
  LeuLeuAlaAsnLysValIlePhePheIle***Ser***IlePheGlyIle***LysIle

---

IleTyrLeuSerSerSerIleLysSerArgGlyLys***Gln***IleGlyLeuPheTyr
 PheIlePheGlnAlaGln***LysAlaAlaValAsnSerAsnLysLeuAlaPhePheIle
  LeuSerPheLysLeuAsnLysLysProArg***IleAlaIleAsnTrpProPheLeuSer

         1390       1400       1410       1420       1430       1440
ATTTATCTTTCAAGCTCAATAAAAAGCCGCGGTAAATAGCAATAAATTGGCCTTTTTTAT
TAAATAGAAAGTTCGAGTTATTTTTCGGCGCCATTTATCGTTATTTAACCGGAAAAAATA

AsnIleLys***Ala***TyrPheAlaAlaThrPheLeuLeuLeuAsnAlaLysLysIle
 LysAspLysLeuSerLeuLeuPheGlyArgTyrIleAlaIlePheGlnGlyLysLysAsp
  ***ArgGluLeuGluIlePheLeuArgProLeuTyrCysTyrIleProArgLys***Arg
```

```
ArgGlnAlaLeuLeuGlyPheSerHisValLeuArgTyrAla***ThrSerHis***Val
 GlyLysLeuPhe***ValPheArgMetTyrCysAspMetHisLysProAlaIleGlu***
  AlaSerSerPheArgPhePheAlaCysIleAlaIleCysIleAsnGlnProLeuSerLys

          1450       1460       1470       1480       1490       1500
CGGCAAGCTCTTTTAGGTTTTTCGCATGTATTGCGATATGCATAAACCAGCCATTGAGTA
GCCGTTCGAGAAAATCCAAAAAGCGTACATAACGCTATACGTATTTGGTCGGTAACTCAT

ProLeuSerLys***ThrLysArgMetTyrGlnSerIleCysLeuGlyAlaMetSerTyr
 AlaLeuGluLysLeuAsnLysAlaHisIleAlaIleHisMetPheTrpGlyAsnLeuLeu
  CysAlaArgLysProLysGluCysThrAsnArgTyrAlaTyrValLeuTrpGlnThrLeu
```

```
SerPhe***AlaHisHisTyrHisLysLeu***ValGlySerLeuGlySerIleCys***
 ValPheLysHisIleThrIleIleSerPheLysLeuValLeuLeuAspGlnPheAlaAsp
  PheLeuSerThrSerLeuSer***AlaLeuSerTrpPheSerTrpIleAsnLeuLeuThr

          1510       1520       1530       1540       1550       1560
AGTTTTTAAGCACATCACTATCATAAGCTTTAAGTTGGTTCTCTTGGATCAATTTGCTGA
TCAAAAATTCGTGTAGTGATAGTATTCGAAATTCAACCAAGAGAACCTAGTTAAACGACT

ThrLysLeuCysMetValIleMetLeuLysLeuAsnThrArgLysSer***AsnAlaSer
 AsnLysLeuValAspSerAspTyrAlaLysLeuGlnAsnGluGlnIleLeuLysSerVal
  Lys***AlaCys*********LeuSer***ThrProGluArgProAspIleGlnGlnCys
```

```
GlnTrpArgLeuProTyrGln***CysIleGlnGly***PhePheGlnValHisSerAsn
 AsnGlyValTyrLeuThrSerAsnValPheLysAlaAsnPhePheLysPheIleProThr
  MetAlaPheThrLeuProValMetTyrSerArgLeuIlePheSerSerSerPheGlnPro

          1570       1580       1590       1600       1610       1620
CAATGGCGTTTACCTTACCAGTAATGTATTCAAGGCTAATTTTTTCAAGTTCATTCCAAC
GTTACCGCAAATGGAATGGTCATTACATAAGTTCCGATTAAAAAAGTTCAAGTAAGGTTG

LeuProThr***ArgValLeuLeuThrAsnLeuAlaLeuLysLysLeuAsnMetGlyVal
 IleAlaAsnValLysGlyThrIleTyrGluLeuSerIleLysGluLeuGluAsnTrpGly
  HisArgLysGly***TrpTyrHisIle***Pro***AsnLys***Thr***GluLeuTrp
```

```
Gln******AlaSerLeuLeuGly***Gly***GlyPheTyrTyrTyrGln***TyrAsn
 AsnAspArgHisHisPheLeuAspArgAspLysValPheIleIleIleAsnAsnIleIle
  MetIleGlyIleThrSerTrpIleGlyIleArgPheLeuLeuLeuSerIleIle***Ser

          1630       1640       1650       1660       1670       1680
CAATGATAGGCATCACTTCTTGGATAGGGATAAGGTTTTTATTATTATCAATAATATAAT
GTTACTATCCGTAGTGAAGAACCTATCCCTATTCCAAAAATAATAATAGTTATTATATTA

LeuSerLeuCys***LysLysSerLeuSerLeuThrLysIleIleIleLeuLeuIleIle
 IleIleProMetValGluGlnIleProIleLeuAsnLysAsnAsnAspIleIleTyrAsp
  HisTyrAlaAspSerArgProTyrProTyrProLys**********TyrTyrLeu***
```

```
GlnAspAsnValGlnIleTyrPheLeuArgGlnThrAsnHisLeuLeuAsnGlnPheLeu
 LysIleMetPheLysTyrThrPhe***GlyArgProThrIleCys***IleSerPheCys
  Arg***CysSerAsnIleLeuSerLysAlaAspGlnProPheValLysSerValPheVal

          1690       1700       1710       1720       1730       1740
CAAGATAATGTTCAAATATACTTTCTAAGGCAGACCAACCATTTGTTAAATCAGTTTTTG
GTTCTATTACAAGTTTATATGAAAGATTCCGTCTGGTTGGTAAACAATTTAGTCAAAAAC

LeuIleIleAsnLeuTyrValLys***ProLeuGlyValMetGln***IleLeuLysGln
[LeuTyrHisGluPheIleSerGluLeuAlaSerTrpGlyAsnThrLeuAspThrLysThr]
  SerLeuThr***IleTyrLysArgLeuCysValLeuTrpLysAsnPhe***AsnLysAsn
```

```
Leu***CysArgHisGlnSer***LeuIleAlaAlaTyrAsnArgHis***ValIleVal
 CysAspValGlyIleAsnHisAsn***LeuLeuLeuIleThrGlyThrGlu***LeuPhe
  ValMet***AlaSerIleIleIleAsnCysCysLeu***GlnAlaLeuSerAsnCysPhe

          1750       1760       1770       1780       1790       1800
TTGTGATGTAGGCATCAATCATAATTAATTGCTGCTTATAACAGGCACTGAGTAATTGTT
AACACTACATCCGTAGTTAGTATTAATTAACGACGAATATTGTCCGTGACTCATTAACAA

GlnSerThrProMetLeu***Leu***AsnSerSerIleValProValSerTyrAsnAsn
[ThrIleTyrAlaAspIleMetIleLeuGlnGlnLysTyrCysAlaSerLeuLeuGlnLys]
  HisHisLeuCys***AspTyrAsnIleAlaAla***LeuLeuCysGlnThrIleThrLys
```

```
PheTyrPhe***SerAspAspLysArgHisLeuTrpSerProThrLeuPheProArgSer
 PheIlePheLysValMetIleLysGlyThrPheGlyHisGlnArgPheSerArgAspLeu
  LeuPheLeuLys*********LysAlaProLeuValThrAsnAlaPheProGluIleSer

          1810       1820       1830       1840       1850       1860
TTTTATTTTTAAAGTGATGATAAAAGGCACCTTTGGTCACCAACGCTTTTCCCGAGATCT
AAAATAAAAATTTCACTACTATTTTCCGTGGAAACCAGTGGTTGCGAAAAGGGCTCTAGA

LysIleLysLeuThrIleIlePheProValLysPro***TrpArgLysGluArgSerArg
[LysAsnLysPheHisHisTyrPheAlaGlyLysThrValLeuAlaLysGlySerIleGlu]
  ***Lys***LeuSerSerLeuLeuCysArgGlnAspGlyValSerLysGlyLeuAsp***
```

```
HisLeuLeuLysGlnLeuAspSerLeuPheGlnGlnThrIlePheValLeuSer***Pro
 IleTyr***AsnSerLeuIleAlaPhePheAsnLysGlnTyrSerCys***ValAsnGln
  SerIleGluThrAla******ProPheSerThrAsnAsnIleArgAlaGluLeuThrSer

          1870       1880       1890       1900       1910       1920
CATCTATTGAAACAGCTTGATAGCCTTTTTCAACAAACAATATTCGTGCTGAGTTAACCA
GTAGATAACTTTGTCGAACTATCGGAAAAAGTTGTTTGTTATAAGCACGACTCAATTGGT

Met***GlnPheLeuLysIleAlaLysLysLeuLeuCysTyrGluHisGlnThrLeuTrp
[AspIleSerValAlaGlnTyrGlyLysGluValPheLeuIleArgAlaSerAsnValLeu]
  ArgAsnPheCysSerSerLeuArgLys***CysValIleAsnThrSerLeu***GlyThr
```

```
ValIleAspArgTyrSer***AsnPheLeuValAspAspPheTyrPhePro******Ile
 ***LeuIleGlyThrLeuLysIlePheLeuLeuMetIlePheIlePheHisAspArgPhe
  Asp******ValLeuLeuLysPheSerCys******PheLeuPheSerMetIleAspLeu

          1930       1940       1950       1960       1970       1980
GTGATTGATAGGTACTCTTAAAATTTTCTTGTTGATGATTTTTATTTTCCATGATAGATT
CACTAACTATCCATGAGAATTTTAAAAGAACAACTACTAAAAATAAAAGGTACTATCTAA

HisAsnIleProValArgLeuIleLysLysAsnIleIleLysIleLysTrpSerLeuAsn
SerGlnTyrThrSerLysPheAsnGluGlnGlnHisAsnLysAsnGluMetIleSerLys
  IleSerLeuTyrGlu***PheLysArgThrSerSerLys***LysGlyHisTyrIle***
```

```
***AsnAsnIleProSerValCysLeuTrpTyrHisAspAspValValValThrIleLeu
 LysIleThrTyrArgGlnTyrValTyrGlyIleMetMetMetTrpSer***GlnSer***
  Lys***HisThrValSerMetPheMetValSer******CysGlyArgAspAsnLeuLys

          1990       2000       2010       2020       2030       2040
TAAAATAACATACCGTCAGTATGTTTATGGTATCATGATGATGTGGTCGTGACAATCTTA
ATTTTATTGTATGGCAGTCATACAAATACCATAGTACTACTACACCAGCACTGTTAGAAT

LeuIleValTyrArg***TyrThr***ProIleMetIleIleHisAspHisCysAsp***
 PheTyrCysValThrLeuIleAsnIleThrAspHisHisHisProArgSerLeuArgLeu
  PheLeuMetGlyAspThrHisLysHisTyr***SerSerThrThrThrValIleLysLeu
```

```
ArgThrPheArgLeuPheTyrValTyr***ThrAlaPheSerLeuSerLys***Ser***
 GluHisLeuGlyTyrPheMetTyrIleGluGlnHisSerArgTyrGlnAsnLysAlaAsn
  AsnIle***ValIleLeuCysIleLeuAsnSerIleLeuAlaIleLysIleLysLeuIle

          2050       2060       2070       2080       2090       2100
AGAACATTTAGGTTATTTTATGTATATTGAACAGCATTCTCGCTATCAAAATAAAGCTAA
TCTTGTAAATCCAATAAAATACATATAACTTGTCGTAAGAGCGATAGTTTTATTTCGATT

SerCysLysPro***LysIleTyrIleSerCysCysGluArg******PheLeuAlaLeu
 PheMet***ThrIleLysHisIleAsnPheLeuMetArgAlaIleLeuIlePheSerIle
  ValAsnLeuAsnAsn***ThrTyrGlnValAlaAsnGluSerAspPheTyrLeu***Tyr
```

```
***HisProIleArgIle*********ThrValSerTyrAsnGlyTyrGlnArgCysSer
AsnIleGlnLeuGluTyrAspAspArgGlnPheHisThrThrValIleLysAspValLeu
  ThrSerAsn***AsnMetMetIleAspSerPheIleGlnArgLeuSerLysMetPheTyr

          2110       2120       2130       2140       2150       2160
TAACATCCAATTAGAATATGATGATAGACAGTTTCATACAACGGTTATCAAAGATGTTCT
ATTGTAGGTTAATCTTATACTACTATCTGTCAAAGTATGTTGCCAATAGTTTCTACAAGA

LeuMetTrpAsnSerTyrSerSerLeuCysAsn***ValValThrIleLeuSerThrArg
 ValAspLeu***PheIleIleIleSerLeuLysMetCysArgAsnAspPheIleAsn***
  CysGlyIleLeuIleHisHisTyrValThrGluTyrLeuPro******LeuHisGluIle
```

```
IleMetAsp***Thr***PheArgSerValPheThrAla******CysGlyGlu***Ser
 LeuTrpIleGluHisAsnLeuAspGlnSerLeuLeuLeuAspAspValAlaAsnLysAla
   TyrGlyLeuAsnIleIle***IleSerLeuTyrCysLeuMetMetTrpArgIleLysArg

            2170       2180       2190       2200       2210       2220
ATTATGGATTGAACATAATTTAGATCAGTCTTTACTGCTTGATGATGTGGCGAATAAAGC
TAATACCTAACTTGTATTAAATCTAGTCAGAAATGACGAACTACTACACCGCTTATTTCG

AsnHisIleSerCysLeuLysSer***AspLysSerSerSerSerThrAlaPheLeuAla
 ***ProAsnPheMetIle***IleLeuArg***GlnLysIleIleHisArgIlePheArg
   IleSerGlnValTyrAsnLeuAspThrLysValAlaGlnHisHisProSerTyrLeuPro

---

GlyLeuTyrGlnValValPheSerAlaAlaValGlnLysSerAsnArgGlyHisThrGly
 GlyTyrThrLysTrpTyrPheGlnArgLeuPheLysLysValThrGlyValThrLeuAla
   ValIleProSerGlyIlePheSerGlyCysSerLysLys***GlnGlySerHisTrpLeu

            2230       2240       2250       2260       2270       2280
GGGTTATACCAAGTGGTATTTTCAGCGGCTGTTCAAAAAAGTAACAGGGGTCACACTGGC
CCCAATATGGTTCACCATAAAAGTCGCCGACAAGTTTTTTCATTGTCCCCAGTGTGACCG

Pro***ValLeuHisTyrLys***ArgSerAsnLeuPheThrValProThrValSerAla
 ThrIleGlyLeuProIleLysLeuProGlnGluPhePheTyrCysProAspCysGlnSer
   AsnTyrTrpThrThrAsnGluAlaAlaThr***PheLeuLeuLeuPro***ValPro***

---

***LeuTyrSerCysSerSerPheAspGluSerGlyCys***ValGluValAspGluLys
 SerTyrIleArgAlaArgArgLeuThrLysAlaAlaValGluLeuArgLeuThrLysLys
   AlaIlePheValLeuValVal***ArgLysArgLeuLeuSer***Gly***ArgLysLys

            2290       2300       2310       2320       2330       2340
TAGCTATATTCGTGCTCGTCGTTTGACGAAAGCGGCTGTTGAGTTGAGGTTGACGAAAAA
ATCGATATAAGCACGAGCAGCAAACTGCTTTCGCCGACAACTCAACTCCAACTGCTTTTT

Leu***IleArgAlaArgArgLysValPheAlaAlaThrSerAsnLeuAsnValPhePhe
 AlaIleAsnThrSerThrThrGlnArgPheArgSerAsnLeuGlnProGlnArgPhePhe
   SerTyrGluHisGluAspAsnSerSerLeuProGlnGlnThrSerThrSerSerPhePhe

---

AsnTyrPro***AspArgIleLysIleSerIle***PheProThrIlePheTyrThrSer
 ThrIleLeuGluIleAlaLeuLysTyrGlnPheAspSerGlnGlnSerPheThrArgArg
   LeuSerLeuArgSerHis***AsnIleAsnLeuIleProAsnAsnLeuLeuHisValAsp

            2350       2360       2370       2380       2390       2400
AACTATCCTTGAGATCGCATTAAAATATCAATTTGATTCCCAACAATCTTTTACACGTCG
TTGATAGGAACTCTAGCGTAATTTTATAGTTAAACTAAGGGTTGTTAGAAAATGTGCAGC

ValIleArgSerIleAlaAsnPheTyr***AsnSerGluTrpCysAspLysValArgArg
 SerAspLysLeuAspCys***PheIleLeuLysIleGlyLeuLeuArgLysCysThrSer
   ***GlyGlnSerArgMetLeuIleAspIleGlnAsnGlyValIleLys***ValAspIle
```

```
Ile***ValHisPhe***GlyTyrThrLysLeuLeuSerAla******IleMetGlyIle
 PheLysTyrIlePheLysValThrProSerTyrTyrArgArgAsnLysLeuTrpGluLeu
  LeuSerThrPheLeuArgLeuHisGlnValIleIleGlyValIleAsnTyrGlyAsnTrp

          2410       2420       2430       2440       2450       2460
ATTTAAGTACATTTTTAAGGTTACACCAAGTTATTATCGGCGTAATAAATTATGGGAATT
TAAATTCATGTAAAAATTCCAATGTGGTTCAATAATAGCCGCATTATTTAATACCCTTAA

AsnLeuTyrMetLysLeuThrValGlyLeu******ArgArgLeuLeuAsnHisSerAsn
 LysLeuValAsnLysLeuAsnCysTrpThrIleIleProThrIlePhe***ProPheGln
  ***ThrCysLys***Pro***ValLeuAsnAsnAspAlaTyrTyrIleIleProIlePro
```

```
GlyGlyAsnAlaLeuArgAsp
 GluAlaMetHis***GluIle
  ArgGlnCysThrGluArg

          2470       2480
GGAGGCAATGCACTGAGAGATC
CCTCCGTTACGTGACTCTCTAG

SerAlaIleCysGlnSerIle
 LeuCysHisValSerLeuAsp
  ProLeuAlaSerLeuSer
```

Anhang I: DNA-Sequenz des rechten zentralen Teils von Tn10. Die Numerierung erfolgt fortlaufend beginnend bei der zur einzelnen XbaI Stelle benachbarten HincII Stelle bis zum rechten IS-Element. Oberhalb und unterhalb der DNA sind die Aminosäuresequenzen der drei möglichen Leseraster gezeigt (Computerprogramm von Dr. G. Steger).

LEBENSLAUF

Name:	Klaus Schollmeier
geb.:	07.03.1957
Mutter:	Johanna Schollmeier, geb. Brechtel
Vater:	Karl Schollmeier
Familienstand:	ledig

Schulbildung

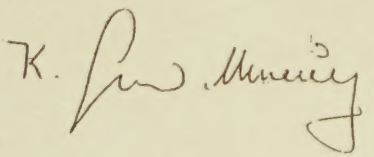
1963 - 1967	Volksschule
1967 - 1976	Gymnasium
1976	Abitur

Wehrdienst	Juli 1976 bis September 1977

Studium

1977 - 1982	Biologiestudium an der Technischen Hochschule Darmstadt mit Abschluß Diplom
November 1982	Beginn der Promotion an der Technischen Hochschule Darmstadt
September 1984	Wechsel an die Universität Düsseldorf

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Düsseldorf, den 15. Mai 1985